

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA
DIVISIÓN DE FARMACOLOGÍA

ACCIÓN DE LA TACRINA SOBRE LA
NEUROTRANSMISIÓN ADRENÉRGICA:
CORRELACIONES CON LAS DISFUNCIONES
COGNOSCITIVAS EN LA RATA

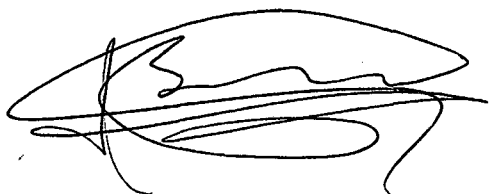
Tesis presentada por Nuria M Vivas Sabido,
para optar al grado de Doctor en Medicina y
Cirugía.

Bellaterra, 10 de Mayo de 1993

ALBERT BADIA i SANCHO, catedrático de Farmacología del Departamento de Farmacología y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, y MARÍA DEL MAR DIERSSEN SOTOS, profesora ayudante de Farmacología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN: que el trabajo de investigación titulado **ACCIÓN DE LA TACRINA SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN ADRENÉRGICA: CORRELACIONES CON LAS DISFUNCIONES COGNOSCITIVAS EN LA RATA**, ha sido realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Farmacología y Psiquiatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, por Nuria María Vivas Sabido, a fin de optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Para que así conste, firmamos este certificado en Bellaterra el día 5 de Mayo de 1993.



Albert Badia i Sancho



María del Mar Dierssen Sotos

Para Emilio, con mi agradecimiento por su paciencia y para mis padres y mi familia por el apoyo y confianza depositado en mi a lo largo de los años.

La presentación de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la colaboración, directa e indirecta, de muchas personas. Mencionarlas aquí a todas es casi imposible, sirvan estas líneas para expresar a todas ellas mi más sincero agradecimiento.

Sí deseo resaltar explícitamente mi gratitud a los directores de esta tesis doctoral, los Doctores Albert Badia y Mara Dierssen, que tan pacientemente me han dirigido durante la realización de este trabajo, así como al Dr Frederic Màrmol del Departamento de Farmacología de la Universidad de Barcelona, que desde el principio fue mi maestro y consejero en muchos de los experimentos realizados.

No quisiera olvidarme de *mi prima* Mireia Verdú. Ella fue quien pensó en mí como candidata a doctoranda.

Asimismo agradezco enormemente la ayuda y paciencia de todos mis compañeros de la Unidad de Farmacología Experimental y Básica por que cada uno ha aportado su granito de arena: Dr Francesc Jané, Dra Elisabet Vila, Dra M^a Victòria Clos, Dr Josep Baños, Dr Joan Sallés, Dr Fèlix Bosch, Antonia Tabernero, Alicia García, Silvia Gascón, Jose Romero, y David Bernabeu.

Finalmente dar mis más efusivas gracias al bebé que estoy esperando por lo bien que se ha portado desde el principio, permitiéndome así materializar este trabajo en forma de Tesis Doctoral.

*El conocimiento y la ciencia de las cosas
se producen cuando hemos logrado
penetrar en sus principios, sus causas y
sus elementos. Aristóteles*

*La solución de un problema cambia el
problema. John Peers*

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	13
SISTEMA ADRENÉRGICO CENTRAL. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN	15
1. ADRENOCEPTORES α_1	19
2. ADRENOCEPTORES α_2	23
3. ADRENOCEPTORES β	24
MODULACIÓN NEUROQUÍMICA DE LOS PROCESOS DE MEMORIA Y APRENDIZAJE	29
ALTERACIONES NEUROQUÍMICAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO Y PROCESOS PATOLÓGICOS RELACIONADOS	37
1. MODIFICACIONES DEL SISTEMA COLINÉRGICO	39
2. ALTERACIONES DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO	42
3. OTROS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN CENTRALES	49
4. ALTERACIONES DE LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL	52
ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS	56
1. TERAPIA COLINÉRGICA	56
1.1. Tacrina	61

2. OTRAS ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS	74
OBJETIVOS	79
MATERIAL Y MÉTODOS	85
MATERIAL	87
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	87
2. FÁRMACOS UTILIZADOS	87
MÉTODOS	88
A. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO	88
1. VALORACIÓN DE LA MEMORIA RECIENTE	88
1.1. Fase de adquisición	91
1.2. Fase de evaluación de la retención	92
2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	93
2.1. Experimentos preliminares	93
2.2. Análisis de la acción de la tacrina sobre los procesos de consolidación en el test de evitación pasiva de un único ensayo	93
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y VALORACIÓN ESTADÍSTICA	93
B. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	94
1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMP CÍCLICO	94
1.1. Estudios preliminares	94

1.1.1. Preparación de la proteína de fijación	94
1.1.2. Ensayo de la proteína de fijación	95
1.1.3. Curva estándar de AMP cíclico	96
1.2. Determinación de los niveles de AMP cíclico	99
1.2.1. Preparación y preincubación de miniprismas cerebrales	99
1.2.2. Tratamiento de los miniprismas con fármacos	100
1.2.3. Medida de la acumulación de AMP cíclico	101
2. MEDIDA DE LA HIDRÓLISIS DE FOSFOINOSÍTIDOS DE MEMBRANA	102
2.1. Preparación de los tejidos	102
2.2. Incorporación de [^3H]-inositol a los fosfoinosítidos de membrana	103
2.3. Estimulación de la acumulación de los fosfatos de [^3H]-inositol	103
2.4. Tratamiento de los miniprismas con tacrina	104
2.5. Separación de los fosfatos de [^3H]-inositol	104
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y VALORACIÓN ESTADÍSTICA	105
C. ESTUDIOS EN ÓRGANO AISLADO	106
1. PREPARACIÓN DE TEJIDOS	106
2. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA	107
2.1. Curvas acumulativas realizadas con isoprenalina	107
2.2. Tratamiento del órgano con tacrina	108

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y VALORACIÓN ESTADÍSTICA	109
RESULTADOS	109
A. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD <i>IN VIVO</i> DE LA TACRINA	111
1. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO	111
1.1. Controles con solución salina	111
1.2. Efectos de la tacrina	112
1.3. Influencia de un bloqueante β -adrenérgico sobre la acción de la tacrina	113
2. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	114
2.1. Modificaciones de los niveles de AMP cíclico asociadas con la edad	115
2.2. Efectos de la inyección aguda de tacrina	117
2.3. Niveles de AMP cíclico en los animales sometidos al test de evitación pasiva	120
2.3.1. Niveles de AMP cíclico en situación control tras la administración de shock	120
2.3.2. Modificación de los niveles de AMP cíclico tras el tratamiento con tacrina	123
B. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA TACRINA	125
1. EFECTOS DE LA TACRINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE AMP CÍCLICO ACOPLADA AL ADRENOCEPTOR β	125
1.1. Análisis del curso temporal de la acción de la tacrina	126
1.2. Curva concentración-respuesta de la tacrina	127

1.3. Influencia de la tacrina sobre la curva concentración respuesta de la isoprenalina	128
1.4. Efectos de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico estimulada por forskolina	129
1.5. Análisis de la acción <i>in vitro</i> de la tacrina	130
1.6. Análisis de la participación del sistema colinérgico en la acción de la tacrina	134
1.6.1. Efecto diferencial de fisostigmina y tacrina	134
1.6.2. Influencia de la atropina en el efecto de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico	138
2. ACCIONES DE LA TACRINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE AMP CÍCLICO ACOPLADA AL ADRENOCEPTOR α_1	140
2.1. Curva concentración-respuesta de la noradrenalina	140
2.2. Influencia de la tacrina sobre la curva concentración-respuesta de la noradrenalina	141
3. ACCIÓN DE LA TACRINA SOBRE LA HIDRÓLISIS DE FOSFOINOSÍTIDOS ESTIMULADA POR NORADRENALINA	142
4. ACCIÓN DE LA TACRINA SOBRE LA RELAJACIÓN PRODUCIDA POR AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA	142
4.1. Curva concentración-respuesta de la isoprenalina	144
4.2. Influencia de la tacrina sobre la curva concentración respuesta de la isoprenalina	145
DISCUSIÓN	147

A. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD *IN VIVO* DE LA TACRINA 149

B. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA TACRINA 162

1. EFECTOS DE LA TACRINA SOBRE EL SISTEMA
 β -ADRENÉRGICO 163

2. EFECTOS DE LA TACRINA SOBRE EL SISTEMA
 α -ADRENÉRGICO 170

CONCLUSIONES 175

BIBLIOGRAFÍA 179

RESUMEN

Las aproximaciones farmacológicas para el tratamiento de las disfunciones cognoscitivas del envejecimiento normal y patológico se han basado clásicamente en la facilitación de la neurotransmisión colinérgica, sin que se hayan obtenido resultados clínicos consistentes. Una excepción es la tacrina, utilizada inicialmente por sus propiedades como anticolinesterásico pero que a diferencia de otros tratamientos es efectiva en las disfunciones cognoscitivas de la enfermedad de Alzheimer. El perfil farmacológico de este fármaco es complejo y su efectividad podría depender de acciones a diversos niveles. Se ha sugerido que la interrelación entre los sistemas colinérgico y noradrenérgico centrales esté implicado en procesos de plasticidad neural y de memoria y aprendizaje. Por ello, el objetivo central de esta Tesis ha sido evaluar la posible participación del sistema β -adrenérgico en la eficacia de la tacrina sobre el deterioro de la memoria reciente asociado al envejecimiento mediante abordajes funcionales y neuroquímicos. Los experimentos realizados sugieren que la capacidad de la tacrina para reducir los déficits cognoscitivos observables en animales de 18 meses, correlaciona a nivel bioquímico con una alteración en el sistema de transducción de señal acoplado al adrenoceptor β en corteza cerebral e hipocampo de rata. Esta acción neuroquímica es específica de la tacrina y podría reforzar procesos fisiológicos relacionados con la consolidación. La caracterización del perfil farmacológico de esta acción en experimentos *in vitro* sugiere que el fármaco no actúa directamente sobre el adrenoceptor β , ya que origina un desplazamiento no paralelo hacia la derecha de la curva concentración-respuesta para la isoprenalina, ni directamente sobre el complejo adenilato ciclasa a través de la subunidad catalítica, ya que tampoco modifica la acción de la forskolina. Su acción podría desarrollarse sobre los procesos de degradación del AMP cíclico en condiciones en las que se encuentran alterados, como sucede en el envejecimiento. Al analizar la posible existencia de un componente colinérgico en la acción del fármaco, se observó que el bloqueo de los receptores muscarínicos previno parcialmente la acción de la tacrina, pero otro anticolinesterásico, la fisostigmina, no modificó los niveles de AMP cíclico. El sistema colinérgico podría ejercer un papel permisivo en la acción de la tacrina, de tal manera que su activación sería necesaria, pero no suficiente, para reproducir su efecto de restablecimiento de la función cognoscitiva, reforzando la idea de una posible relación entre los sistemas β adrenérgico y colinérgico en el cerebro.

Los resultados que se presentan sugieren que la efectividad de la tacrina puede depender de su acción sobre el sistema de transducción de señal intracelular acoplada a la activación del adrenoceptor β , lo que la convierte en un instrumento farmacológico de excepción para abordar el tratamiento de las deficiencias cognitivas del anciano, al afectar simultáneamente los sistemas noradrenérgico y colinérgico centrales. Más aún, el sistema β -adrenérgico juega un papel fundamental en la memoria reciente, de forma que el equilibrio correcto de la respuesta intracelular es crucial para el procesamiento de la información.

INTRODUCCIÓN

SISTEMA ADRENÉRGICO CENTRAL. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN

La existencia de neuronas noradrenérgicas en el sistema nervioso central fue sugerida por primera vez por Vogt en 1954, que demostró la presencia de noradrenalina en el cerebro, con una distribución que no seguía la de los vasos sanguíneos, y por lo tanto, no representaba la inervación simpática vascular. El desarrollo de un método histoquímico de fluorescencia para la determinación de noradrenalina, permitió la demostración directa de la presencia de noradrenalina a nivel neuronal. En 1964 Dahlström y Fuxe utilizaron esta técnica para caracterizar la distribución de la neuronas noradrenérgicas centrales. Estos autores demostraron que los cuerpos neuronales noradrenérgicos se encontraban confinados en el tronco del encéfalo en agrupaciones separadas denominadas A₁-A₇, siendo la más importante la A₆, el locus coeruleus. Este núcleo pigmentado era conocido desde hacía tiempo, pero se conocía relativamente poco acerca de sus conexiones y de su significación hasta que se demostró que estaba enteramente constituido por neuronas noradrenérgicas. En 1979 Moore y Bloom agruparon todas las demás neuronas noradrenérgicas del tronco del encéfalo en un único sistema no-cerúleo, que denominaron el sistema tegmental ventral. Este sistema incluye cuerpos celulares bulbares asociados con el núcleo del tracto solitario o el núcleo dorsal del vago, y grupos celulares del tegmentum lateral y grupos celulares pontinos e ístmicos.

El locus coeruleus es un núcleo compacto en la mayor parte de las especies, que se localiza en la región alta de la protuberancia. En la rata se compone de unas 1500 células que constituyen el 43% de todas las neuronas noradrenérgicas centrales. El estudio de la ultraestructura de este núcleo revela la presencia de cuerpos celulares en los que se demuestran vesículas de almacenamiento de noradrenalina en las ramas dendríticas y los terminales axónicos. Existen múltiples contactos axodendríticos, axosomáticos y dendrodendríticos entre tales estructuras noradrenérgicas (Shimizu y cols, 1979). El locus coeruleus tiene tres proyecciones principales: ascendentes, descendentes y cerebelosas. La proyección ascendente se ramifica en tres, la vía noradrenérgica dorsal, una segunda vía que sigue el fascículo dorsal longitudinal y una tercera proyección en la que las fibras noradrenérgicas viajan por el tracto tegmental ventral y siguen la vía prosencefálica medial.

De estas proyecciones la más importante es la vía noradrenérgica dorsal, que asciende en posición ventrolateral a la sustancia gris periacueductal, entra en el hipotálamo y llega al septum. De allí penetra en el cíngulo, junto al que rodea el cuerpo calloso. A lo largo de su recorrido emite terminaciones a múltiples núcleos del mesencéfalo (núcleo dorsal del rafe, tubérculos cuadrigéminos), diencéfalo (varias áreas talámicas, núcleos hipotalámicos, núcleos habenules) y telencéfalo (amígdala, hipocampo, sustancia innominada, corteza entorrina y todo la neocorteza). Estudios realizados mediante el uso de lesiones neurotóxicas selectivas han demostrado que la neocorteza, la formación hipocámpica, el cerebelo y varios núcleos sensoriales reciben su inervación noradrenérgica exclusivamente del locus coeruleus, mientras que en el hipotálamo, el tálamo, el séptum y el mesencéfalo la inervación noradrenérgica procedente del locus coeruleus se ve complementada por proyecciones derivadas de los núcleos tegmentales laterales.

En cuanto a las otras dos proyecciones que emite el locus coeruleus, una se dirige al cerebelo, donde inerva tanto la corteza como los núcleos centrales. Por último, la vía descendente originada en el locus coeruleus inerva el núcleo dorsal del vago, el complejo oliva inferior y las astas anteriores y posteriores a todo lo largo de la médula espinal.

Además del locus coeruleus existen otros sistemas noradrenérgicos originados en núcleos bulbares y pontinos. Su distribución es más restringida y se solapa parcialmente con la de este sistema. No inerva a la neocorteza, pero sí a la amígdala y al tubérculo olfatorio. Proyecta masivamente al hipotálamo, al mesencéfalo, y a algunos núcleos del telencéfalo.

Por otra parte, el locus coeruleus recibe proyecciones desde múltiples regiones cerebrales. Muchas de ellas parecen ser conexiones recíprocas, dado que proceden de áreas cerebrales que son inervadas desde el locus coeruleus. Entre ellas se encuentra la amígdala o la zona marginata del asta posterior de la médula espinal. Existen asimismo proyecciones desde los núcleos del fastigio y los núcleos vestibulares y desde las áreas hipotalámicas. Sin embargo, las aferencias más importantes proceden de dos núcleos bulbares: el núcleo paragigantocellularis medialis y el nucleo prepositus hypoglossii. Asimismo existen evidencias de la participación colinérgica en la transmisión nerviosa del locus coeruleus.

Las catecolaminas adrenalina y noradrenalina se sintetizan y liberan desde las terminaciones nerviosas y las células cromafines, provocando múltiples acciones por estimulación de los diferentes subtipos de adrenoceptores. La clasificación de los adrenoceptores en los subtipos α y β se debe a Ahlquist (1948). Posteriormente cada tipo se subdividió en base al orden de potencias de una serie de catecolaminas estructuralmente relacionadas en experimentos de baño de órgano aislado, así tenemos los adrenoceptores α_1 y α_2 (Langer, 1974) y los β_1 y β_2 (Lands y cols, 1967).

Esta aproximación, apoyada en algunos casos por estudios de fijación con radioligandos, ha proporcionado la evidencia de al menos tres subtipos para cada uno de los adrenoceptores α_1 (Han y cols, 1987b), α_2 (Bylund, 1988) y β (Kaumann, 1989). La evidencia de múltiples subtipos de adrenoceptores fue tomada, en principio, con escepticismo especialmente mientras estuvo basada en estudios de fijación de radioligandos. Sin embargo, esta clasificación ha resultado ser algo conservadora. Los avances de las técnicas de biología molecular que han proporcionado información estructural definitiva sobre muchos de los nuevos subtipos de adrenoceptores (Dohlman y cols, 1991; Strosberg, 1991).

Todos los adrenoceptores de secuencia conocida pertenecen a la familia de receptores caracterizada por estar ligada a una proteína de fijación de nucleótidos de guanina (proteína G), tener siete dominios transmembranarios (Dixon y cols, 1986; Kobilka y cols, 1987a-c; Cotecchia y cols, 1988; Emorine y cols, 1989; Dohlman y cols, 1991), y en el caso de algunos mejor caracterizados, como el adrenoceptor β_2 , se ha demostrado que poseen regiones que son críticas para el acoplamiento de la proteína G, la activación por agonistas, la fijación de radioligandos y de las protein kinasa, que pueden ser A y C y la kinasa que fosforila los adrenoceptores β (Dohlman y cols, 1991).

Los adrenoceptores están acoplados a sus sistemas efectores por medio de una proteína de fijación de nucleótidos de guanina (Birnbaumer, 1990). Esta familia de proteínas son trímeros, compuestos por la subunidad β de 35-37 kDa, la subunidad τ de 8-10 kDa y la α de 45-52 kDa. Las subunidades β y τ se encuentran estrechamente asociadas entre sí y son muy similares en las diferentes proteínas G. La subunidad α se desacopla rápidamente de la

subunidad β/τ y es muy diferente para cada una de las proteínas G. En estado basal, la proteína G se encuentra unida al GDP por el sitio con actividad catalítica GTPásica de la subunidad α .

Las interacciones del agonista con el receptor acoplado inducen la liberación de GDP que es reemplazado por GTP. El complejo GTP-subunidad α se disocia de las subunidades β/τ , siendo el complejo $G\alpha$ -GTP el que interacciona con la proteína efectora. La hidrólisis del GTP a GDP por la GTPasa de la subunidad α da como resultado la reasociación con las subunidades β/τ . La activación de la proteína G requiere por tanto la asociación del GTP a la subunidad α , mientras que la desactivación necesita de su hidrólisis a GDP. Es por ello que los análogos no hidrolizables del GTP como el guanilil-5'-imidodifosfato [Gpp(NH)p] activan la proteína G de manera irreversible.

Existen tres grandes subgrupos de adrenoceptores que, a su vez, se acoplan a través de tres clases de proteína G a sus sistemas efectores (Bylund, 1988). Los adrenoceptores α_1 se acoplan a la fosfolipasa C específica de los fosfoinosítidos por una proteína G, probablemente la G_q (Smrcka y cols, 1991), los α_2 que interaccionan con la adenilato ciclasa a través de la G_i produciendo su inhibición, y los β que activan la adenilato ciclasa vía la proteína G_s .

Las proteínas G han sido localizadas por autorradiografía, usando directamente [3 H]-GTP o bien su análogo no hidrolizable [3 H]-Gpp(NH)p (Gehlert, 1986; Gehlert y Walmsley, 1986). En el cerebro de rata, la distribución resultó ser heterogénea, con niveles altos en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, putamen, caudado, sustancia negra y cerebelo. Sin embargo, cuando el marcaje se realiza así no es posible distinguir entre las diferentes proteínas G, ya que todas fijan nucleótidos de guanina.

Se pueden delimitar las distintas proteínas G utilizando la particularidad de que la subunidad α difiere entre ellas (Gilman, 1987). Se han preparado y marcado sondas con oligonucleótidos específicos para identificar, por hibridación *in situ*, las diferentes subunidades $G_s\alpha$ en secciones de tejido (Brann y cols, 1987; Largent y cols, 1988). La hibridación *in situ* ha puesto de manifiesto que en el cerebro hay ARN mensajero de la

subunidad G_{α} en concentraciones elevadas en el plexo coroideo, hipocampo, cerebelo y corteza cerebral, y a menores niveles en el globo pálido, corteza olfatoria, núcleos talámicos y tronco del encéfalo (Largent y cols, 1988). La distribución del ARN mensajero de la G_{α} en la rata es similar (Brann y cols, 1987).

1. ADRENOCEPTORES α_1

Como el resto de adrenoceptores, el receptor α_1 se diferenció originalmente por el orden de potencias de una serie de agonistas y antagonistas. Así, los adrenoceptores α_1 se estimulan selectivamente con metoxamina o fenilefrina y se bloquean específicamente con prazosín. Sin embargo, cada vez resulta más evidente que existen múltiples subtipos del receptor, en base a estudios de fijación de radioligandos, a estudios funcionales y a la medida de los niveles de segundos mensajeros (Minneman, 1988).

Los sitios de fijación identificados por el radioligando (-)-[125 I]-BE 2254 son inactivados de manera diferencial por el agente alquilante cloroetilclonidina (CEC) en diferentes tejidos. En hígado y bazo, el tratamiento con CEC elimina completamente la fijación, mientras que en hipocampo y conducto deferente la cloroetilclonidina carece prácticamente de efecto (Han y cols, 1987a).

La inhibición de la fijación por WB 4101 y benoxatán también es diferente en hígado y bazo en comparación con la fijación observada en el hipocampo y el conducto deferente, donde el antagonista es más potente pero presentaba un coeficiente de Hill inferior a la unidad (Han y cols, 1987a).

Estos resultados sugieren la presencia de dos subtipos de adrenoceptores, el α_{1A} y el α_{1B} , en hipocampo y conducto deferente de rata. Sin embargo, en hígado y bazo la población de receptores α_1 es homogénea y se corresponde farmacológicamente con el subtipo de adrenoceptores α_{1B} . Ambos subtipos son sensibles a la inhibición por prazosín, mientras que el α_{1A} es antagonizado selectivamente por el WB 4101. Además este adrenoceptor se acopla

al canal de calcio sensible a las dihidropiridinas, mientras que el subtipo α_{1B} se acopla directamente a la hidrólisis de fosfoinosótidos (Han y cols, 1987b).

Esta subclasificación de los adrenoceptores α_1 , en α_{1A} y α_{1B} , se ha podido confirmar e incluso ampliar utilizando técnicas de biología molecular, con las que se han conseguido clonar varios receptores α_1 -adrenérgicos distintos.

El primero de ellos presenta alta afinidad por el prazosín y baja afinidad por el WB 4101 y la fentolamina, se inactiva por CEC y se acopla a la fosfolipasa C específica de los fosfoinosótidos. Se determinó que pertenecía al subtipo α_{1B} (Cotecchia y cols, 1988).

El otro, procedente de cerebro de ratas corresponde al subtipo α_{1A} porque es sensible al WB 4101 y el ARN mensajero que codifica esta secuencia puede ser detectado en muchos tejidos de rata, entre ellos el conducto deferente, hipocampo, aorta, corazón y bazo (Lomasney y cols, 1991).

Un nuevo receptor, el α_{1C} , se ha aislado de un ADN del cerebro de vacas. Este subtipo presenta la misma afinidad por el prazosín y el WB 4101 que el α_{1A} pero es susceptible a la inactivación por CEC (Schwinn y cols, 1990).

Los receptores α_1 -adrenérgicos pertenecen a la clase de receptores que inician su efecto fisiológico produciendo cambios en la actividad celular por aumento de los niveles intracelulares de calcio libre. Este incremento lo consiguen por el acoplamiento, a través de la proteína G_q , con la fosfolipasa C que hidroliza el fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato de la membrana celular (Berridge, 1984). De la fosfolipasa C dependiente de fosfoinosótidos se han aislado al menos ocho isoenzimas (Crooke y Bennett, 1989).

La estimulación del receptor conduce a la producción de segundos mensajeros, que incluyen el diacilglicerol (DAG), el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y el 1,3,4,5-tetrakisfosfato. Se han identificado sitios de fijación específica para el diacilglicerol, el IP_3 y quizás para el inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato. El diacilglicerol se encarga de estimular la protein kinasa C

(Nishiuzuka, 1984). El IP_3 induce la liberación de calcio de sus depósitos intracelulares no mitocondriales, por la fijación en sitios localizados en los canales de calcio, retículo endoplasmático y calciosomas (Streb y cols, 1983; Guillemette y cols, 1987; Berridge e Irvine, 1989; Challis y cols, 1991). El cerebelo contiene concentraciones particularmente altas de sitios de fijación al $[^3H]$ - IP_3 , lo que ha facilitado el aislamiento de una proteína que probablemente sea el receptor del IP_3 (Supattapone y cols, 1988; Furiuchi y cols, 1989; Mignery y cols, ,1989). El inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato se cree que controla el transporte de calcio dentro de los almacenamientos sensibles al IP_3 , pero todos los intentos para caracterizar un sitio de fijación en el cerebro no han fructificado todavía. Sin embargo, hay sitios de fijación específica en algunos tejidos periféricos (Nahorski y Potter, 1989).

Además de estimular el metabolismo de los fosfoinosítidos de membrana, los receptores α_1 -adrenérgicos, también están acoplados directamente a la entrada de calcio (canal de calcio sensible al receptor) (Han y cols, 1987b).

Por otra parte, en el cerebro de los mamíferos la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos también aumenta la acumulación de AMP cíclico y potencia los aumentos en la acumulación de AMP cíclico producidos por otros agonistas tales como los agonistas β -adrenérgicos o la adenosina (Schultz y Daly, 1973; Daly y cols, 1981). Los aumentos de la acumulación de AMP cíclico mediados por los adrenoceptores α_1 pueden ser secundarios a la hidrólisis de fosfoinosítidos y a aumentos del calcio intracelular (Daly y cols, 1981).

Johnson y Minneman (1987) describieron que la acumulación basal de AMP cíclico mediada por receptores α_1 no se afectaba por EGTA, sugiriendo que no es secundaria a la formación de fosfatos de inositol en respuesta a la estimulación α_1 -adrenérgica.

Los cambios en los niveles de AMP cíclico pueden deberse a modificaciones en el porcentaje de degradación. Sin embargo, los aumentos de AMP cíclico observados por Johnson y Minneman (1987) no se debían a una disminución de la degradación ya que los efectos del potente inhibidor de la fosfodiesterasa, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), a concentraciones que aumentan al máximo los niveles basales de AMP cíclico, eran aditivos a los aumentos

mediados por los receptores α_1 -adrenérgicos. En estos experimentos también se demuestra que el aumento de la acumulación basal de AMP cíclico no depende de la actividad de los receptores de adenosina.

Por otra parte, el pretratamiento de los tejidos con cloroetilclonidina (CEC), un bloqueante irreversible de los adrenoceptores α_{1B} , disminuía los aumentos del AMP cíclico basal mediados por adrenoceptores α_1 . Si la CEC fuera selectiva de los receptores α que median los aumentos de la acumulación basal de AMP cíclico, se esperaría que tuviera un escaso efecto en los receptores del hipocampo donde hay poca o ninguna respuesta del AMP cíclico basal. Esta predicción es así, sugiriendo que los receptores α_1 -adrenérgicos del hipocampo no son idénticos a los de la corteza cerebral (Johnson y Minneman, 1987).

Hollingsworth y cols (1986) describieron que agentes que aumentan la actividad de los canales de sodio, aumentan la acumulación de AMP cíclico y la formación de fosfatos de inositol en sinaptoneurosomas de corteza cerebral de cobayo, sugiriendo que la actividad de los canales de sodio voltaje-dependientes conduce, vía la entrada de iones sodio, a la activación del metabolismo del fosfatidilinositol y a la activación resultante de la protein kinasa C dependiente del diacilglicerol, que a su vez está asociada a un aumento de la respuesta de los sistemas formadores de AMP cíclico en tejidos cerebrales. En contraste, agentes que afectan el transporte de calcio o su acción no modifican marcadamente ni la formación de fosfatos de inositol ni la acumulación de AMP cíclico. En los tejidos cerebrales parece ser que la activación de la protein kinasa C más que la movilización de calcio es la conexión principal entre el metabolismo de fosfatos de inositol y el aumento en la acumulación de AMP cíclico.

De esta manera, los receptores α_1 -adrenérgicos pueden estar ligados a más de un mecanismo de transducción o pueden existir distintos subtipos de adrenoceptores α_1 , cada uno de ellos acoplado a un mecanismo de transducción (García-Sainz y Hernández-Sotomayor, 1985).

Se ha estudiado la localización de los adrenoceptores α_1 en el sistema nervioso central con técnicas autorradiográficas. Los estudios realizados con los radioligandos [125 I]-BE 2254 y

[³H]-prazosín, que no muestran selectividad por los subtipos α_{1A} o α_{1B} (Johnson y Minneman, 1986; Morrow y Creese, 1986; Han y cols, 1987b), demuestran grandes concentraciones de los adrenoceptores α_1 en el bulbo olfatorio, tálamo, núcleo geniculado medial y neocorteza y bajos niveles en el hipocampo (Palacios y cols, 1987).

2. ADRENOCEPTORES α_2

Tradicionalmente se han definido los receptores α_2 -adrenérgicos por presentar alta afinidad por el agonista clonidina y el antagonista rauwolscina y baja afinidad por el antagonista α_1 prazosín. Sin embargo, incluso en los primeros estudios resultó evidente la existencia de variaciones regionales y entre especies en la afinidad de los fármacos selectivos para desplazar al ligando [³H]-rauwolscina de su fijación específica al adrenoceptor α_2 (Cheung y cols, 1982; Neylon y Summers, 1985). Estudios posteriores realizados con receptores solubilizados, para eliminar las posibles contribuciones de otros componentes de la membrana, confirmaron estos hallazgos (Cheung y cols, 1986).

La presencia de múltiples subtipos de adrenoceptores α_2 está apoyada por varias líneas de evidencias, la más potente de las cuales es el clonaje y secuenciación de cuatro receptores α_2 -adrenérgicos. Otras pruebas a favor de la heterogeneidad de este receptor son el desarrollo de fármacos específicos para los distintos subtipos como el SKF 104078 (Ruffolo y cols, 1987) y la caracterización de varias líneas celulares que expresan un único subtipo de receptores (Bylund y cols, 1988).

Los estudios de fijación con radioligandos han identificado al menos dos subtipos de adrenoceptores α_2 (Bylund, 1985; Boyajian y Leslie, 1987), aunque pueden existir más. Estos subtipos se han denominado R_s , que es el sitio sensible a la rauwolscina y por el cual es específico el B-HT920; y R_i , que es el sitio insensible a la rauwolscina, y por el cual es más específica la guanfacina. La clonidina, un agonista α_2 clásico, es inespecífica, aunque presenta una afinidad algo mayor por el sitio R_s .

Los adrenoceptores α_2 se acoplan a la adenilato ciclasa a través de la proteína G_i y alternativamente a canales iónicos. Así, alteran la actividad celular por reducción de los niveles intracelulares de AMP cíclico (Gilman, 1984) o bien modificando directamente la actividad de los canales iónicos, como la bomba sodio/protones, o los canales de calcio o potasio (Bylund, 1988).

La distribución a nivel del sistema nervioso central de los receptores α_2 -adrenérgicos es tanto presináptica en terminaciones adrenérgicas como a nivel postsináptico en células no adrenérgicas (U'Prichard y cols, 1979). Hay receptores α_2 -adrenérgico a nivel de las terminales nerviosas adrenérgicas, en ellos la noradrenalina inhibe su propia liberación. También están presentes en muchos terminales nerviosos colinérgicos periféricos, de manera que la noradrenalina liberada de los nervios simpáticos puede inhibir nervios colinérgicos adyacentes (Starke y Docherty, 1980).

Se han empleado cinco ligandos para identificar los adrenoceptores α_2 en el sistema nervioso central: [^3H]-clonidina, *p*-[^3H]-aminoclonidina, [^3H]-rauwolscina, [^3H]-idazoxan y (-)-[^{125}I]-clonidina. La distribución de la fijación para la *p*-[^3H]-aminoclonidina y el [^3H]-idazoxan es similar, pero la [^3H]-rauwolscina marca muchos menos sitios y con una distribución diferente. El significado de estas diferencias puede reflejar una fijación a diferentes subtipos del adrenoceptor α_2 (Boyajian y Leslie, 1987). Se ha identificado fijación al adrenoceptor α_2 en la corteza cerebral, hipotálamo, locus coeruleus, núcleo del tracto solitario, rafe y comisura (Boyajian y cols, 1987).

3. ADRENOCEPTORES β

Farmacológicamente, los adrenoceptores β clásicos se han definido como receptores en los cuales la (-)-isoprenalina actúa como un agonista y el (-)-propranolol como un antagonista. Lands y cols (1967) caracterizaron farmacológicamente los subtipos de adrenoceptores β_1 y β_2 . Más recientemente el uso de técnicas de biología molecular ha proporcionado nueva información sobre la estructura y dominios funcionales del receptor β (Tota y cols, 1991).

Hay compuestos altamente selectivos capaces de discernir los dos subtipos clásicos de adrenoceptores β . Los agonistas selectivos incluyen el Ro 363 para el subtipo β_1 (McPherson y cols, 1984) y el procaterol del β_2 (Yabuuchi, 1977); mientras que entre los antagonistas selectivos tenemos para el subtipo β_1 el CGP-20712A (Dooley y cols, 1986; Molenaar y Summers, 1987), cuyo isómero ($\pm$) es entre 5000 y 10000 veces más selectivo por este subtipo (Molenaar y Summers, 1987), y el ICI 118,551 para el subtipo β_2 (O'Donnell y Wanstall, 1980; Bilski y cols, 1983).

Desde el punto de vista farmacológico varias evidencias apoyan la existencia de otros subtipos de adrenoceptores β diferentes de los clásicos. Se ha propuesto que los adrenoceptores β de algunas regiones como el tracto gastrointestinal, el músculo esquelético y el tejido adiposo son atípicos (Wilson y cols, 1984; Bojanic y cols, 1985). En los adipocitos los antagonistas propranolol, atenolol e ICI 118,551 muestran valores de pA_2 bajos, frente a diferentes agonistas (Harms y cols, 1977; Arch y cols, 1984; Wilson y cols, 1984; Bojanic y cols, 1985). Estos valores de pA_2 tan bajos indican que el receptor no es de los subtipos β_1 o β_2 (Arch, 1989), conduciendo al concepto de adrenoceptor β_3 .

Se han desarrollado agonistas específicos, como el BRL 28410 y BRL 37344, que estimulan específicamente la lipólisis en los adipocitos marrones (Arch y cols, 1984), estimulan el metabolismo e inhiben la síntesis de glucógeno en el músculo esquelético (Challis y cols, 1988) y causan relajación de la musculatura lisa del tracto gastrointestinal (MacLaughlin y MacDonald, 1990).

La mayoría de los estudios de fijación con radioligandos han resultado ser inconcluyentes, bien por el uso de radioligandos, como el [3H]-dihidroalprenolol, que presenta baja afinidad por el receptor β_3 , o bien por la presencia en la misma preparación de los otros dos subtipos (Arch, 1989). Estudios recientes realizados en musculatura esquelética de rata indican que el (-)-[^{125}I]-cianopindolol en presencia de propranolol puede identificar el adrenoceptor β atípico, mediante experimentos de fijación de radioligandos o por autorradiografía (Molenaar y cols, 1992). La aproximación molecular ha tenido éxito al clonar y secuenciar el adrenoceptor β_3 de varias especies (Emorine y cols, 1989).

Los diferentes subtipos del adrenoceptor β están acoplados a la adenilato ciclasa a través de la proteína G_s y producen alteraciones de la actividad celular aumentando los niveles intracelulares de AMP cíclico. Los niveles celulares del segundo mensajero, AMP cíclico están influidos por la actividad de la adenilato ciclasa, la cual es a su vez controlada por la activación de los receptores unidos a membrana y las proteínas G encargadas de la transducción de la señal.

Hay evidencias bioquímicas (Pfeuffer y cols, 1985; Mollner y Pfeuffer, 1988) y de biología molecular (Krupinski y cols, 1989) que sugiere la existencia de varias formas de adenilato ciclasa con unos pesos moleculares de 115-150 kDa. La principal herramienta para localizar la adenilato ciclasa es el diterpeno forskolina. La forskolina estimula la adenilato ciclasa directamente y, a menores concentraciones, aumenta la acumulación de AMP cíclico en respuesta a la estimulación de receptores unidos a la proteína G_s . La [3H]-forskolina se une con alta afinidad a la adenilato ciclasa y existe una excelente correlación entre la capacidad de los análogos para estimular la adenilato ciclasa e inhibir la fijación de la [3H]-forskolina (Laurenza y cols, 1989).

Los estudios bioquímicos realizados con [3H]-forskolina demuestran la existencia de dos sitios de fijación (Seamon y cols, 1984; McMartin y Summers, 1990) con alta y baja afinidad. En el cerebro de rata se localizan altas concentraciones de sitios de fijación en caudado-putamen, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, globo pálido y sustancia negra.

El complejo neurotransmisor-receptor acoplado a la adenilato ciclasa consta al menos de tres componentes. En la superficie exterior de la membrana se localiza el receptor con el sitio de fijación específica. El segundo componente es una proteína G que puede estimular (G_s) o inhibir (G_i , acoplada al adrenoceptor α_2) la enzima adenilato ciclasa. El tercer componente es la unidad catalítica, lugar de conversión del ATP a AMP cíclico (Gilman, 1984; Sibley y Lefkowitz, 1985).

La secuencia de eventos que da lugar a la activación de la adenilato ciclasa es la siguiente: la unión del neurotransmisor a un receptor promueve la fijación de la proteína G_s , formando

un complejo de alta afinidad cuya aparición es limitante en el proceso de activación. En presencia de GTP el complejo se separa del receptor y se convierte en G_s -GTP. Este complejo muestra menos afinidad por el agonista. El complejo GTP- G_s interacciona con la adenilato ciclasa y activa el sistema enzimático, cuya vida está regulada por la actividad GTPasa. La proteína G y el medio catalítico son reciclados por acción de la GTPasa, que convierte GTP unido, en el inactivo GDP (Gilman, 1984; Sibley y Lefkowitz, 1985).

Los antagonistas de los adrenoceptores β , como el propranolol, pueden unirse al receptor y bloquear el acceso del agonista. La unión del antagonista no promueve la formación del complejo agonista-receptor-proteína G, por lo que la adenilato ciclasa no se activa y en consecuencia no hay respuesta celular.

Los aumentos intracelulares de AMP cíclico se traducen en la activación de una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico que media la fosforilación de las proteínas diana, provocando las respuestas metabólicas y fisiológicas en las células. Esta enzima es un tetramero con dos subunidades regulatorias (R) y dos catalíticas (C). Las subunidades R se unen al AMP cíclico provocando la disociación del tetramero, que entonces cataliza la fosforilación ATP-dependiente de proteínas que alteran la actividad celular. Se ha detectado la existencia de al menos dos isoenzimas que presentan diferente localización y especificidad por el neurotransmisor (Gundlach y Urošević, 1989).

El marcaje selectivo de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos se consigue con el empleo de fármacos desplazantes altamente selectivos, como el CGP-20712A, que es selectivo del adrenoceptor β_1 (Dooley y cols, 1986) o el ICI 118,551, selectivo para el subtipo β_2 (Bilski y cols, 1983). En el cerebro, se encuentran concentraciones elevadas del receptor β -adrenérgico en la corteza cerebral, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, globo pálido, hipocampo, sustancia negra y cerebelo. Atendiendo a los diferentes subtipos en corteza cerebral, hipocampo y tálamo el 80-90% aproximadamente, son del subtipo β_1 (Palacios y Kuhar, 1982; Rainbow y cols, 1984; Pazos y cols, 1985), mientras que el subtipo β_2 representa el 80-90% de los adrenoceptores β totales en el cerebelo (Jones y cols, 1990).

El hipocampo es la región del cerebro donde los receptores β -adrenérgicos muestran el patrón de distribución de mayor densidad en el hombre (Reznikoff y cols, 1986; Lemmer y cols, 1993). Además se localizan cerca del complejo adenilato ciclasa. Por otra parte, se ha demostrado, utilizando anticuerpos específicos, que los adrenoceptores β tienen una localización postsináptica en las neuronas (Strader y cols, 1983).

En el hipocampo se han descrito regulaciones a la baja del adrenoceptor β provocadas por la exposición a agonistas β -adrenérgicos, por el tratamiento crónico con desmetilimipramina o por electroshock, acompañadas por una disminución en el grado de estimulación de la formación de AMP cíclico por noradrenalina y forskolina (Newman y Lerer, 1989).

La desensibilización de los receptores β -adrenérgicos por agonistas implica el desacoplamiento rápido del receptor a la adenilato ciclasa, acompañado de una lenta disminución y desaparición de los receptores de la superficie celular (Su y cols, 1980). A nivel funcional hay una disminución en la capacidad de los agonistas para estimular la adenilato ciclasa y modificaciones en las propiedades de unión a receptores por parte de los agonistas. Los receptores no acoplados son menos capaces de formar el complejo de unión de alta afinidad (De Lean y cols, 1980). Una parte de los receptores β -adrenérgicos son internalizados durante la desensibilización, quedando secuestrados en vesículas de membrana que son deficitarias en adenilato ciclasa: se produce una regulación a la baja (Sibley y Lefkowitz, 1985). Cuando el agonista disminuye o desaparece se produce el proceso opuesto.

La desensibilización del receptor β , por el tratamiento crónico con antidepresivos, es responsable de la disminución de la respuesta del AMP cíclico a la noradrenalina en miniprismas de corteza cerebral (Newman y Lerer, 1989). La desensibilización puede dar lugar a un aumento de la adenilato ciclasa cuando la enzima desacoplada es estimulada a nivel post-receptorial (Newman y cols, 1986; Newman y cols, 1987).

MODULACIÓN NEUROQUÍMICA DE LOS PROCESOS DE MEMORIA Y APRENDIZAJE

La memoria y el aprendizaje son procesos biológicos que pueden ser contemplados como una forma especial de plasticidad, dado que, como consecuencia de la experiencia, se producen cambios plásticos tanto en la morfología cerebral, como en diferentes parámetros neuroquímicos y fisiológicos en muchas especies y paradigmas experimentales (Rose, 1989). El aprendizaje y la memoria no se producen aislados de otros procesos cognoscitivos. Lo que se recuerda y en qué medida se recuerda depende de factores muy diversos tales como el nivel de atención y de vigilancia en el momento del aprendizaje y de la naturaleza de los acontecimientos que se producen inmediatamente después de que la información ha sido registrada. La experiencia produce cambios plásticos a nivel neuroquímico pero se ha de considerar además, que determinadas vías o sistemas de neurotransmisión que no son en sí mismas objeto de cambios plásticos pueden afectar el desarrollo, mantenimiento y expresión de la plasticidad en los sitios de almacenamiento de la memoria (Krasne, 1978).

En modelos de conducta animal se ha podido demostrar que gran número de fármacos administrados inmediatamente después de una experiencia pueden alterar o facilitar los procesos de retención de la misma. La inyección post-entrenamiento afecta los procesos que operan inmediatamente después de la adquisición, pero no el proceso de registro de la información, procesos específicos de recuerdo o funciones motoras o sensoriales necesarias para la realización del test de conducta. Este hecho conduce a plantear cuáles son los sistemas de neurotransmisión implicados en la memoria y cómo ejercen su papel modulador. Sin embargo, a pesar de la existencia en la literatura de numerosos datos experimentales que apoyan la participación de diferentes sistemas neuroquímicos en los procesos de adquisición y de retención, el papel concreto de cada uno de ellos no ha podido ser determinado.

Uno de los sistemas de neurotransmisión que se implicó de forma muy inicial en los procesos de memoria fue el sistema colinérgico central, llegándose a postular que las sinapsis colinérgicas podían ser en sí mismas el sitio de almacenamiento de la memoria (Deutsch, 1971). Sin embargo, la caracterización posterior de la distribución anatómica de este sistema

de neurotransmisión, en el que la mayor parte de la acetilcolina de la neocorteza provenía del prosencéfalo basal, hizo deshechar tal hipótesis. La distribución ascendente con una amplia proyección del sistema colinérgico, sugería más bien que se tratara de un sistema de carácter modulador, más que un sistema de almacenaje de información. Sin embargo, la significación del sistema colinérgico como sistema modulador de la memoria no está clara.

Experimentalmente, se ha podido constatar mediante estudios conductuales la implicación del sistema colinérgico en la memoria. Se ha observado que la interrupción de la transmisión colinérgica central mediante agentes bloqueantes muscarínicos clásicos, como la atropina o la escopolamina pueden interferir tanto con la adquisición de estímulos aversivos, como con la ejecución de diversos hábitos aprendidos (Hearst, 1959; Buresova y cols, 1964; Aigner y Mishkin, 1986). Por otra parte, la fisostigmina, al igual que otros agonistas muscarínicos, son capaces de mejorar la realización de determinadas tareas de aprendizaje y memoria (Deutsch, 1971; Aigner y Mishkin, 1986; Flood, 1988). Más aún, los voluntarios jóvenes tratados con escopolamina exhiben disfunciones de memoria similares a las detectadas en sujetos ancianos normales y en mayor grado en pacientes dementes. Esta disfunción es reversible con fisostigmina, sugiriendo que el empeoramiento de la memoria se correlaciona con la alteración de la transmisión colinérgica (Drachman, 1974).

Posteriormente, la realización de estudios sistemáticos (Deutsch, 1971) confirmó la implicación de los mecanismos colinérgicos en el aprendizaje y la memoria. Basándose en las alteraciones de comportamiento inducidas por fármacos y en la estratégica posición del sistema colinérgico en las funciones nerviosas superiores, especialmente el aprendizaje y la memoria, Bartus y cols (1982) formularon la hipótesis colinérgica de las disfunciones de memoria geriátricas, que correlaciona la pérdida de capacidad cognoscitiva que se produce en sujetos ancianos sanos y en pacientes con enfermedad de Alzheimer, con una eficiencia disminuida del sistema colinérgico en el prosencéfalo. Esta hipótesis dio lugar al diseño de varias estrategias terapéuticas cuya finalidad era restablecer la funcionalidad del sistema colinérgico dañado, una tendencia que se ha mantenido durante años, con escaso éxito clínico.

Todos los datos referidos apoyan de forma clara la participación del sistema colinérgico en los procesos de memoria. Sin embargo, no hemos de olvidar que la influencia de los fármacos de naturaleza colinérgica se diferencia sustancialmente de otras sustancias en la forma de ejercer sus efectos sobre los procesos de memoria. Así, son las únicas sustancias para las que se han descrito efectos contrapuestos dependiendo del tiempo que se tardan en administrar después del entrenamiento (Bures y cols, 1962; Baratti y cols, 1979). Además estas sustancias alteran la realización de los test conductuales durante periodos muy prolongados de tiempo, virtualmente, tanto como perdura el recuerdo de la experiencia original.

Así, la inyección de oxotremorina, un agonista colinérgico muscarínico muy potente, con actividad central (Choi y cols, 1973), inmediatamente después de la fase de entrenamiento mejora la retención en el test de evitación pasiva (Baratti y cols, 1970). Esta amina terciaria aumenta los niveles cerebrales de acetilcolina y disminuye su velocidad de recambio (Cheney y Costa, 1977). Por otro lado, además de su acción sobre el sistema colinérgico, la oxotremorina reduce los niveles cerebrales de noradrenalina (Corrodi y cols, 1967; Roger y Slater, 1971), provoca un aumento en la actividad de la enzima tirosinhidroxilasa, que interviene en la síntesis de noradrenalina en el locus coeruleus (Lewander y cols, 1979) e incrementa la excitabilidad de las neuronas dopaminérgicas centrales. Las catecolaminas liberadas probablemente por la oxotremorina, pueden modular los procesos neuronales relacionados con el almacenamiento de información novedosa (McGaugh y cols, 1975), ya que de hecho, algunas de las acciones farmacológicas de la oxotremorina son antagonizables por fármacos que inhiben la función adrenérgica (Sharma, 1970). En esta misma línea, fármacos inhibidores de la monoaminooxidasa (MAO), que pueden prevenir la degradación de las catecolaminas liberadas por oxotremorina, potencian la acción de esta sustancia. Así, el pretratamiento con inhibidores de la MAO (IMAO), como la nialamida produce, cuando es administrada junto con dosis de oxotremorina que no resultan eficaces en las pruebas de memoria, una clara mejoría de la retención (Huygens y cols, 1980). Finalmente, si se produce una deplección de catecolaminas cerebrales, como ocurre tras la inyección intracerebro-ventricular de α -metil-*p*-tirosinmetilester (α -MPT), un inhibidor del enzima tirosinhidroxilasa (Huygens y cols, 1980) que por sí mismo no modifica la retención, se

antagoniza el efecto de la inyección postentrenamiento de oxotremorina. Todos estos datos experimentales sugieren que la adecuada funcionalidad de las neuronas catecolaminérgicas centrales es necesaria para que tenga lugar la mejoría de la retención inducida por oxotremorina (Huygens y cols, 1980). Por lo tanto, el efecto facilitador de la oxotremorina, no solamente apoya la participación del sistema colinérgico en los procesos de retención sino que sugiere la existencia de una interacción con los sistemas catecolaminérgicos centrales.

Además del deterioro de la neurotransmisión serotoninérgica y noradrenérgica observado en la enfermedad de Alzheimer, hay evidencias por estudios comportamentales usando animales y humanos, que estas monoaminas pueden relacionarse con procesos cognoscitivos y de memoria. Los mecanismos pueden ser directos o indirectos, vía interacción con otros neurotransmisores o como consecuencia secundaria de otras modulaciones del comportamiento, como por ejemplo la actividad, la vigilancia, el estado anímico, etc (McEntee y Crook, 1990).

Los cuerpos neuronales noradrenérgicos del locus coeruleus, de los cuales proviene la noradrenalina presente en el prosencéfalo, se despolarizan con relación al nivel de vigilancia del animal, y pueden activarse de forma fásica por luces, señales acústicas u otros estímulos (Foote y cols, 1983). Ello hace pensar que el locus coeruleus juega un papel importante activando las neuronas del prosencéfalo frente a la aparición de estímulos externos para su procesamiento.

Así pues, la noradrenalina interviene en las funciones de aprendizaje y memoria, en tanto en cuanto una vigilancia incrementada puede contribuir a un mejor procesamiento de la información (Saper, 1987). Dado que la formación de la memoria no tiene lugar completamente en el momento del aprendizaje, podría ser que, además, la noradrenalina influyese en los procesos de aprendizaje y memoria por producir, poco después de completar el aprendizaje, un estado de atención incrementada. Aunque la participación del sistema noradrenérgico en la memoria y el aprendizaje parecen claras, el sentido de su acción moduladora no se conoce bien por el momento y no se ha podido demostrar la participación directa de este sistema de neurotransmisión en los procesos cognoscitivos.

Diversos estudios (Davies y cols, 1974) indican que puede alterarse la retención con tratamientos que afectan a los sistemas catecolaminérgicos cerebrales. Se ha sugerido que manipulaciones farmacológicas que producen una facilitación de la actividad noradrenérgica en el sistema nervioso central mejoran la realización cognoscitiva en animales y humanos, y contrariamente, que su ejecución empeora si se reduce la actividad noradrenérgica central (Davis y cols, 1988; Zornetzer, 1985).

La deplección de catecolaminas cerebrales producida por la inyección intracerebro-ventricular preentrenamiento de un inhibidor del enzima tirosinhidroxilasa, como es el α -MPT, no modifica la retención de los ratones en el test de evitación pasiva (Huygens y cols, 1980), aunque otros trabajos indican que se produce un empeoramiento de la retención en las tareas de evitación pasiva después de la deplección de catecolaminas (Rake, 1973; McGaugh y cols, 1975; Karpiak y cols, 1976). Sin embargo, existen datos en la literatura que sugieren que el papel del sistema noradrenérgico es más complejo. Así, se ha demostrado que la activación del adrenoceptor α_2 mejora la memoria reciente (Arnsten y Goldman-Rakic, 1987). Aunque los autores adscribieron este efecto a una acción fundamentalmente postsináptica, no se puede descartar que se trate de un efecto a nivel presináptico, ya que ésta es la localización más frecuente del adrenoceptor α_2 , en cuyo caso se produciría una reducción en la liberación de noradrenalina.

La deplección de noradrenalina presenta efectos poco importantes sobre el aprendizaje y la memoria, en comparación con los provocados tras la disrupción de la función colinérgica (Wenk y cols, 1987). Sin embargo, esta deplección empeora la retención a largo plazo en las pruebas de evitación inhibitoria y de adquisición de información espacial en el test del water-maze (Prado de Carvalho y Zornetzer, 1981; Decker y McGaugh, 1989). Esta deficiencia es similar al *olvido rápido* característico de los animales viejos (Ruthrich y cols, 1982; Zornetzer y cols, 1982; Martínez y Rigter, 1983).

Por otra parte, determinadas manipulaciones noradrenérgicas pueden mejorar algunas deficiencias de aprendizaje y memoria relacionadas con la edad. Así, existen estudios que apuntan a que la clonidina puede revertir las deficiencias cognoscitivas en monos viejos

(Arnsten y Goldman-Rakic, 1985). De la misma manera, la estimulación de la actividad noradrenérgica central parece mejorar la retención en el test de evitación pasiva en ratones viejos (Zornetzer, 1985).

En estudios de condicionamiento clásico (McCormick y Thompson, 1982) se demostró que la lesión bilateral del locus coeruleus, que como hemos mencionado anteriormente constituye la fuente de aferencias noradrenérgicas del prosencéfalo, no afecta el proceso de adquisición en conejos. La lesión electrolítica de este mismo núcleo, que consigue una deplección de más del 80% de la noradrenalina del prosencéfalo, no modifica el aprendizaje en un laberinto en T (Mason, 1981). Son necesarias lesiones prácticamente totales de las neuronas noradrenérgicas para apreciar algún efecto conductual en ratas jóvenes. Esto sucede por causa de la rápida recuperación del sistema noradrenérgico, probablemente debida a que el sistema del locus coeruleus es capaz de compensar una lesión parcial, por ejemplo aumentando la síntesis de noradrenalina, sin que se produzca una hipoestimulación significativa de los adrenoreceptores α_1 (Abercrombie y Zigmond, 1989). Por lo tanto, la falta de efecto de las lesiones noradrenérgicas a nivel experimental puede ser debida en parte a la rápida recuperación de este sistema o bien a que su papel modulador es más complejo.

La participación del sistema noradrenérgico en procesos cognoscitivos se refleja asimismo en estudios electroencefalográficos en los que se analiza la actividad talámica. La actividad eléctrica de la neocorteza en las ratas jóvenes se caracteriza por una actividad electroencefalográfica desincronizada. Sin embargo, cuando el animal permanece inmóvil y despierto, se producen ondas breves de alta frecuencia, que representan las oscilaciones talámicas.

El sistema noradrenérgico del locus coeruleus inerva los núcleos talámicos, modulando su actividad eléctrica a través de receptores α -adrenérgicos (McCormick y Prince, 1988; McCormick, 1989) y afectando así las oscilaciones talámicas (Buzsáki y cols, 1990). La estimulación de los adrenoreceptores α_1 talámicos produce una disminución de la conductancia en reposo al potasio, resultando en un enlentecimiento de la despolarización de membrana (McCormick y Prince, 1988).

Un abordaje diferente de la cuestión es estudiar enfermos cuyo sistema noradrenérgico se encuentra lesionado. Un ejemplo de ello serían los pacientes con síndrome de Korsakoff, en los que se observan deficiencias cognoscitivas tras el abuso continuado de alcohol. En estos pacientes se ha podido evidenciar una deplección cerebral de noradrenalina, de forma que en un estudio con nueve pacientes alcohólicos, McEntee y Mair (1978) pudieron correlacionar la gravedad de la alteración de la memoria con la concentración del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), principal metabolito de la noradrenalina, detectable fácilmente en líquido cefalorraquídeo obtenido a nivel lumbar.

Si bien las evidencias experimentales presentadas sugieren la participación del sistema noradrenérgico en la memoria y el aprendizaje, el mecanismo íntimo de su acción moduladora no ha podido ser establecido, al menos por el momento. Una posibilidad que se contempla es que exista una interacción entre los sistemas noradrenérgico y colinérgico a nivel central, que podría modular los procesos de aprendizaje y memoria. En efecto, la interacción entre ambos sistemas en el cerebro parece jugar un papel importante en el proceso de aprendizaje y la memoria (Kruglikov, 1982; Decker y Gallagher, 1987), así como en la plasticidad neural (Bear y Singer, 1986). En efecto, parece claro que ambos sistemas de neurotransmisión modulan de forma conjunta la plasticidad neural a nivel cortical (Kasamatsu, 1983). Así por ejemplo, se ha podido observar en cortes finos de hipocampo de rata incubados con noradrenalina, un incremento de la duración de los cambios sinápticos producidos en las fibras musgosas tras la estimulación de alta frecuencia (Hopkins y Johnston, 1984).

A nivel neuroquímico, se conoce perfectamente que la noradrenalina disminuye la liberación de acetilcolina en los terminales nerviosos colinérgicos de la corteza cerebral, tanto en tejido aislado como *in vivo* (Vizi, 1980; Moroni y cols, 1983). Este efecto es mediado, aparentemente, por un mecanismo directo a nivel del receptor α -adrenérgico en las terminales colinérgicas e indirectamente a través de la modulación noradrenérgica de la liberación de ácido γ -aminobutírico (GABA) (Beani y cols, 1986). Por el contrario, la liberación de noradrenalina en el área medial septal aumenta el recambio de acetilcolina en el hipocampo (Robinson y cols, 1978).

Por otra parte, en sinaptosomas de hipocampo, la estimulación muscarínica inhibe la síntesis de noradrenalina por una acción mediada a través de receptores muscarínicos del subtipo M_1 , y simultáneamente inhibe la liberación de noradrenalina a través de receptores M_2 (Birch y Fillenz, 1986). Del mismo modo, también las neuronas del locus coeruleus pueden estar influidas por acción de la acetilcolina, a través de receptores M_2 (Egan y North, 1985).

Así pues vemos que diferentes estudios conductuales han podido demostrar, que, si bien la noradrenalina *per se* no modifica la formación de la memoria, es capaz de ejercer un efecto sinérgico con la modulación del sistema colinérgico y esta interacción podría involucrar mecanismos β -adrenérgicos (Decker y cols, 1990).

De todo lo que se ha referido en apartados anteriores se desprende que los adrenoceptores α y β parecen jugar un importante papel en el nivel de atención, en el estado anímico y en la memoria, así como en las modificaciones de estas funciones asociadas con la edad (Scarpace y Abrass, 1988). Es por ello que el análisis de su número y su funcionalidad pueden ser claves para comprender el deterioro cognoscitivo. El hecho de que se haya constatado la lesión del sistema noradrenérgico con la edad hace plausible inferir que exista un deterioro en los sistemas de adrenoceptores.

En los procesos de memoria también intervienen otros sistemas de neurotransmisión, entre ellos los que emplean aminoácidos, tanto excitatorios como inhibitorios. Así, se ha observado que la D-cicloserina, un agonista parcial que puede activar el sitio de la glicina en ausencia o a bajas concentraciones de ésta, pero que se vuelve un inhibidor cuando aumenta la concentración de glicina, mejora la ejecución de tareas de aprendizaje en las ratas (Monaghan y cols, 1989), y revierte las deficiencias de memoria inducidas con escopolamina en voluntarios jóvenes y adultos (Wesnes y cols, 1991a,b).

Además el milacemide, un fármaco que puede ser metabolizado *in vivo* a glicina, aumenta el aprendizaje en ratas normales y en aquellas con amnesia inducida por fármacos (Handelmann y cols, 1989).

ALTERACIONES NEUROQUÍMICAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO Y PROCESOS PATOLÓGICOS RELACIONADOS

El trastorno global de las funciones intelectuales superiores que se produce durante el envejecimiento es un síndrome frecuente tanto en personas normales como en aquellas afectadas de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central. La fisiopatología de tales procesos es compleja, y de hecho las alteraciones morfológicas y neuroquímicas que se observan en el anciano presentan diferencias cuantitativas más que cualitativas respecto a las acaecidas en la demencia senil. Así, las modificaciones neurodegenerativas en enfermedades como la de Alzheimer podrían estar basadas en alteraciones de los sistemas de neurotransmisión centrales similares a las que se producen durante el envejecimiento normal, de forma que las bases fisiopatológicas del deterioro cognoscitivo serían similares en ambos casos. En aquellas situaciones en que estos cambios son más acusados se relacionan con las características clínicas de la demencia, las cuales abarcan desde pérdida de la memoria y desorientación visoespacial hasta rasgos psicóticos como depresión.

A pesar de que el riesgo de demencia aumenta exponencialmente después de la década de los setenta, la prevalencia alcanza un 13-22% entre los 85-89 años de edad (Hofman y cols, 1991; Rocca y cols, 1991). La enfermedad de Alzheimer está asociada a depósitos de placas neuríticas que contienen una proteína amiloide y ovillos de neurofibras, y es la más común de las demencias (Rocca y cols, 1991). Una asunción generalizada acerca de la demencia del tipo Alzheimer es que las vías neuronales corticales intrínsecas están destruidas, constituyendo el núcleo de sucesos neurodegenerativos de la enfermedad. La presencia de numerosas placas neuríticas y de nudos neurofibrilares en áreas como el hipocampo y la corteza entorrinal (Ince y cols, 1991), sugieren un compromiso primario de las neuronas intrínsecas en estas áreas, con alteraciones concomitantes en los sistemas que proyectan hacia la corteza colinérgica, noradrenérgica y serotoninérgica. Como la mayoría de las neuronas intrínsecas utilizan aminoácidos excitatorios (ácido glutámico o aspártico) o ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor, se ha supuesto que en esta enfermedad hay alteraciones de estos sistemas.

Sin embargo, los mecanismos moleculares de los procesos neurodegenerativos que tienen lugar durante el envejecimiento normal y patológico del sistema nervioso no se conocen bien. En general, se ha encontrado que muchas funciones del sistema nervioso central disminuyen con el proceso de envejecimiento. Diversos datos experimentales sugieren que primariamente se produce una disminución en la capacidad para mantener la homeostasis, de forma que con la edad disminuyen muchas respuestas tanto hormonales como a neurotransmisores, a diferentes niveles (Roth, 1984). Durante el proceso de envejecimiento puede haber una disminución persistente de las aferencias neuronales causada, por ejemplo, por degeneración neuronal, o quizás por una disminución del *input* hormonal causado por una disminución de la función de las glándulas endocrinas (Weiss y cols, 1984). Generalmente los organismos jóvenes pueden compensar esta disminución adaptando la densidad de sus receptores postsinápticos (Cantor y cols, 1981). En edades avanzadas estos mecanismos de regulación para determinados receptores parecen ser deficientes, dando lugar a una disminución, relacionada con la edad, de la capacidad para compensar los cambios del entorno hormonal o neuronal (Freilich y Weiss, 1983). Esto se puede apreciar por la menor capacidad de síntesis de receptores en animales viejos (Zhou y cols, 1984; Greenberg y cols, 1985).

En los últimos años se ha desarrollado un interés considerable en la patología neuroquímica de las enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Alzheimer, de Huntington o de Parkinson. El análisis del estado de los sistemas de neurotransmisión puede proporcionar una valiosa información acerca de la selectividad del proceso degenerativo. En fases tempranas de la enfermedad pueden aparecer anomalías en la transmisión sináptica en un sistema neuronal intacto, pero a medida que avanza la enfermedad se hace patente la alteración de los diferentes elementos pre y postsinápticos. En esta situación, el receptor podría estar afectado primariamente, y las alteraciones en su número podrían ser motivadas por cambios en la síntesis, degradación o modulación de los receptores (Scarpace y Abrass, 1988).

La mayor parte de los estudios se limitan a medir formación, concentración y degradación de neurotransmisores que documentan las modificaciones en los principales sistemas de neurotransmisión, a nivel postsináptico. El análisis se restringe generalmente a la

determinación de la densidad de los diferentes receptores mediante estudios de fijación de radioligandos. Desgraciadamente, una fijación de ligandos al receptor inalterada no implica necesariamente un acoplamiento normal del receptor con el sistema de formación de segundos mensajeros (Ohm y cols, 1989). Es por ello que en estudios recientes se ha empezado a analizar la integridad funcional de los sistemas efectores celulares en las enfermedades neurodegenerativas. Esto resulta fundamental, ya que las estrategias terapéuticas más frecuentemente utilizadas en las deficiencias cognitivas de la enfermedad de Alzheimer se basan en la restitución de los sistemas de neurotransmisión afectados, y asumen que el receptor se encuentra funcionalmente intacto, de forma que el incremento de la actividad sináptica, mediante la administración de agonistas u otras estrategias, se traduciría en un aumento de la respuesta postsináptica.

Una cuestión clave en la interpretación de las consecuencias clínicas de la alteración de los sistemas de neurotransmisores en la demencia es la significación funcional de los cambios neuroquímicos o neuropatológicos que tienen lugar. El cerebro posee un alto grado de redundancia o capacidad compensatoria de tal forma que muchas alteraciones pueden no ser clínicamente relevantes, a pesar de estar claramente relacionados con la etiología de la enfermedad. En cualquier caso, la demostración de los déficits neuroquímicos asociados a los diferentes sistemas de neurotransmisión, además de proporcionar información acerca del proceso anatomopatológico, brinda una base racional para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

1. MODIFICACIONES DEL SISTEMA COLINÉRGICO

Entre las anomalías de neurotransmisores más documentadas y aparentemente primarias en la enfermedad de Alzheimer se encuentra la pérdida de marcadores colinérgicos en la corteza cerebral. Esta pérdida es mayor en las regiones temporales, incluyendo el hipocampo, y se relacionan más estrechamente con las deficiencias cognitivas, fundamentalmente con la pérdida de memoria (Perry y cols, 1978).

Una actividad colinérgica reducida en la demencia del tipo Alzheimer se ha hecho responsable de al menos algunos de los síntomas de la enfermedad, especialmente de las deficiencias de memoria (Whitehouse y cols, 1982; Coyle y cols, 1983). Está bien establecido que la síntesis de acetilcolina, la actividad acetilcolintransferasa y acetilcolinesterasa y la recaptación de colina están sustancialmente disminuidas en los cerebros de enfermos de Alzheimer (Davis y Maloney, 1976; Perry y cols, 1977; Sims y cols, 1983).

Los datos bioquímicos y neurofarmacológicos acerca de la alteración de la acetilcolina han dado lugar a la formulación de la hipótesis colinérgica de la disfunción geriátrica de los procesos cognoscitivos (Bartus y cols, 1982). En su formulación más simple, esta teoría propone que el sistema colinérgico ascendente, como componente del sistema activador ascendente de la corteza cerebral, es un determinante fundamental de los déficits funcionales que se observan en la enfermedad de Alzheimer.

Sin embargo, está bien establecido que la enfermedad de Alzheimer no sólo afecta al sistema colinérgico, sino también a sistemas peptidérgicos y catecolaminérgicos (Haroutunian y cols, 1988). Estos datos podrían explicar el hecho de que estudios recientes realizados en humanos indican que los fármacos antimuscarínicos, como la escopolamina, no son un modelo para las deficiencias cognoscitivas vistas en la enfermedad de Alzheimer (Fibiger, 1991). En efecto, las deficiencias específicas producidas por la escopolamina en humanos difieren sustancialmente de las que aparecen en la enfermedad de Alzheimer (Beatty y cols, 1982, 1988; Troster y cols, 1989), de hecho estas diferencias tienen más peso que las similitudes. Existen diferencias, por ejemplo, en el patrón de cambios del flujo sanguíneo cerebral producido por la escopolamina y el observado en los enfermos de Alzheimer (Honer y cols, 1988). Esto no sorprende porque mientras los antagonistas muscarínicos producen un bloqueo agudo y corto de los receptores muscarínicos, principalmente postsinápticos, en la enfermedad de Alzheimer los desórdenes son irreversibles, crónicos, de progresión lenta y además de las alteraciones colinérgicas presinápticas hay alteraciones patológicas en el resto de sistemas de neurotransmisión. Además, como también existen alteraciones de los receptores nicotínicos, los antagonistas muscarínicos no pueden ser el modelo ideal de las

deficiencias cognitivas de esta enfermedad. Sin embargo, la razón de más peso para deshechar el modelo de la escopolamina como modelo del deterioro cognoscitivo que se produce en el envejecimiento y la demencia es que la lesión simple del sistema colinérgico no es suficiente para explicar la cohorte de síntomas y hallazgos neuropatológicos y neuroquímicos que se producen en tales procesos.

Las primeras evidencias de la alteración de este sistema de neurotransmisión parte de estudios *post mortem* en corteza cerebral de pacientes con la enfermedad de Alzheimer en los que se observa menor actividad acetilcolintransferasa respecto a casos control. Recientemente se ha descrito una pérdida del 60% de la actividad acetilcolintransferasa hipocámpica en sujetos no-dementes de entre 30 y 100 años, frente a un 70% de reducción en los ancianos dementes (Perry y cols, 1992). La acetilcolintransferasa es una enzima necesaria para la síntesis de acetilcolina, que se encuentra confinada en las neuronas colinérgicas. Tiene la ventaja de mantenerse relativamente estable después del fallecimiento (al contrario que la acetilcolina), por lo que puede utilizarse como marcador *post mortem* de la integridad de las neuronas colinérgicas.

También se ha demostrado una disminución de la actividad del enzima acetilcolinesterasa en la enfermedad de Alzheimer. Davies y Maloney (1976) observaron que los niveles de los enzimas acetilcolintransferasa y acetilcolinesterasa estaban marcadamente disminuidos en los cerebros de pacientes de la enfermedad de Alzheimer, principalmente en corteza cerebral, correlacionando, además, con las zonas que contienen mayor densidad de ovillos neurofibrilares. Mesulam y cols (1987) observaron que en pacientes de Alzheimer los axones que normalmente contenían acetilcolinesterasa estaban gravemente disminuidos. También vieron actividad butirilcolinesterásica en los ovillos y las placas neurofibrilares, cuando este enzima no suele ser visible en axones.

Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal degeneran en el curso de la enfermedad de Alzheimer, conduciendo a una disminución de los marcadores colinérgicos de la neocorteza. Esta pérdida neuronal se produce fundamentalmente en el núcleo basal de Meynert, que es la principal fuente de la entrada colinérgica extrínseca al hipocampo. Además el núcleo basal

de Meynert es una parte especializada del sistema general de activación ascendente (Buzsáki y cols, 1988).

La interacción de los receptores muscarínicos M_1 con la proteína G puede estar deteriorada en la enfermedad de Alzheimer cuando se mide por la modulación con nucleótidos de guanina de la fijación de pirenzepina en corteza parietal (Smith y cols, 1987). La respuesta al nucleótido de guanina se ve disminuida un 50% en la enfermedad de Alzheimer frente al control. La disfunción del complejo colinérgico del prosencéfalo basal especialmente de la vía septo-hipocámpica, puede estar relacionada con las deficiencias de aprendizaje espacial en ratas viejas (Fischer y cols, 1989; Brandeis y cols, 1990; Gallagher y cols, 1990).

2. ALTERACIONES DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO

Se ha podido demostrar que la neurotransmisión adrenérgica empeora en el curso del envejecimiento normal y está sustancialmente disminuida en la demencia del tipo Alzheimer, con una profunda pérdida de células catecolaminérgicas del locus coeruleus (Bondareff y cols, 1982; Carlsson, 1987). Ello ha llevado a postular que las alteraciones de la neurotransmisión noradrenérgica central podrían contribuir al empeoramiento de las funciones cognitivas y en las deficiencias de memoria asociadas al envejecimiento y a la enfermedad de Alzheimer. El deterioro observado podría, además tener relación con el que se produce en el sistema colinérgico (Coyle y cols, 1983; Mann, 1983; Decker, 1987).

Se ha sugerido que la disfunción noradrenérgica puede contribuir a las deficiencias de memoria relacionadas con la edad (Zornetzer, 1985; McEntee y Crook, 1990). La activación de las neuronas del locus coeruleus puede disminuir con la edad (Olpe y Steimann, 1982) al igual que el contenido de noradrenalina en neocorteza (Luine y cols, 1990), hipotálamo y cerebro medio de ratas viejas (Rogers y Bloom, 1985). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la activación de las neuronas noradrenérgicas puede no haber disminuido e incluso podría aumentar en la corteza cerebral y el hipocampo de ratas viejas (Buu y Bebinski, 1990; Valjakka y cols, 1990). Por el contrario, se ha observado un aumento de la

concentración plasmática de noradrenalina con la edad, que puede deberse a una mayor actividad del enzima dopamina- β -hidroxilasa que aumenta con la edad en las glándulas adrenales de rata (Banerji y cols, 1984) y en suero humano (Freedman y cols, 1972).

La actividad metabólica y neurofisiológica de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus disminuye con el envejecimiento (Olpe, 1982; McIntosh y Westfal, 1987). Las fibras ascendentes del locus coeruleus pueden activar las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (Zaborsky y cols, 1992). Sin embargo, en estudios recientes se ha visto que las lesiones noradrenérgicas no afectan la actividad del sistema colinérgico núcleo basal-corteza, ni la actividad acetilcolintransferasa o la recaptación de alta afinidad de colina en ratas jóvenes (Riekkinen y cols, 1990b).

Es tentador especular que las lesiones noradrenérgicas pueden producir mayores deficiencias funcionales y bioquímicas en las ratas viejas que en las jóvenes, dado que el sistema locus coeruleus disminuye con la edad (Leslie y cols, 1985; Valjakka y cols, 1990). Por ejemplo, la actividad neurofisiológica y metabólica de las neuronas del locus coeruleus disminuyen con la edad (Olpe, 1982; McIntosh y Westfal, 1987). La deplección parcial de noradrenalina puede aumentar la actividad eléctrica si, como parece, los mecanismos de recuperación de las neuronas noradrenérgicas están comprometidos en las ratas viejas (Riekkinen y cols, 1990a). Además la privación de las aferencias noradrenérgicas ascendentes sobre las neuronas colinérgicas dañadas del núcleo basal de Meynert en las ratas viejas, puede producir una mayor disrregulación y pérdida de funciones colinérgicas (Riekkinen y cols, 1990a).

Valjakke y cols (1990) han descrito que los niveles de noradrenalina en corteza cerebral, hipocampo y prosencéfalo se encuentran aumentados en las ratas Wistar viejas. Ellos sugieren que podría existir una relación con una disminución de la liberación del neurotransmisor.

Riekkinen y cols (1992) han observado que las ratas viejas tratadas con la toxina noradrenérgica, clorhidrato de N-(2-cloroetil)-*n*-etil-2-bromobencilamina (DSP-4) tienen niveles de noradrenalina significativamente menores. Es razonable pensar que las

modificaciones metabólicas que sufre el sistema noradrenérgico haga que las ratas viejas sean más sensibles a las propiedades neurotóxicas del DSP-4 que las ratas jóvenes. Además estos autores comprobaron que la lesión noradrenérgica no afecta la actividad colinérgica del núcleo basal de Meynert que proyecta sobre la corteza cerebral, ni tampoco la actividad acetilcolintransferasa de la corteza frontal ni en ratas jóvenes ni en viejas. Esto sugiere que la privación de las aferencias noradrenérgicas ascendentes a las neuronas colinérgicas dañadas del núcleo basal de Meynert, no compromete la actividad metabólica de estas neuronas en ratas viejas.

Parece que una proporción significativa de pacientes de Alzheimer tienen una deplección considerable de noradrenalina en corteza cerebral y muestran un recambio disminuido de este neurotransmisor. Sin embargo, otros estudios sugieren que ni los niveles de noradrenalina ni de sus metabolitos se modifican con la edad en la corteza cerebral (Moretti y cols, 1987). Estas deficiencias corticales están acopladas con una apreciable pérdida de células pigmentadas del locus coeruleus. En general, parece que las mayores deficiencias noradrenérgicas están asociadas a la enfermedad de Alzheimer de aparición temprana.

Se van acumulando evidencias que sugieren que las deficiencias noradrenérgicas (pérdida celular en el locus coeruleus, o de neurotransmisores de la corteza cerebral o bien de los niveles de sus metabolitos) son más marcadas en pacientes diagnosticados de demencia que presentan una depresión concomitante. Esta observación es consistente con la hipótesis noradrenérgica de la depresión (Zubenko y cols, 1990).

En tejidos procedentes de autopsias de pacientes de la enfermedad de Alzheimer los sitios de fijación α -adrenérgicos, que podrían localizarse a nivel de las terminales noradrenérgicas presinápticas, disminuyen así como los niveles de noradrenalina del núcleo basal de Meynert/sustancia innominata. Estas deficiencias pueden empeorar la función de las ya comprometidas neuronas colinérgicas del prosencéfalo. Es posible que las deficiencias noradrenérgicas puedan influir la respuesta del sistema nervioso central a los fármacos colinomiméticos y podría indicar la necesidad de un tratamiento con fármacos combinados que potencien ambos sistemas.

Algunos estudios han mostrado que las deficiencias de memoria pueden tener una relación paralela en ratas jóvenes y viejas con lesiones de la fimbria-fornix, que interrumpen las aferencias y eferencias de la formación hipocámpica (Dunnett y cols, 1988; Kametani y cols, 1989). Se ha sugerido que un sistema noradrenérgico superactivo agravaría las deficiencias de aprendizaje relacionadas con lesiones colinérgicas, en ratas con la fimbria-fornix lesionada (Sara, 1989). Además, las deficiencias de aprendizaje inducidas por lesiones de esta región son parcialmente aliviadas por depresión de la actividad noradrenérgica usando clonidina, un agonista α_2 -adrenérgico, o por lesiones parciales del sistema noradrenérgico con DSP-4 (Sara, 1989).

El contenido en noradrenalina de la corteza cerebral no correlaciona significativamente con el aprendizaje/memoria espacial puesto de manifiesto con los tests del water-maze o el circular-maze, pero correlaciona con la realización del T-maze en ratas viejas (Markowska y cols, 1989). Gallagher y cols (1990) encontraron que el contenido en noradrenalina de la corteza frontal estaba ligeramente aumentado en las ratas viejas, especialmente en los individuos con deficiencias en el water-maze, pero encontraron mejores correlaciones entre la disfunción colinérgica y la capacidad de aprendizaje en el water-maze.

En las ratas viejas el contenido en noradrenalina a nivel hipocámpico no se afecta y no correlaciona con la realización en el laberinto radial (Luine y cols, 1990). Estos resultados no sugieren ninguna relación consistente entre las deficiencias de memoria espacial relacionadas con la edad y la función noradrenérgica presináptica. Los efectos de la administración de DSP-4 en este tipo de memoria difieren entre ratas jóvenes y viejas. La adquisición de la tarea en el water-maze estaba marcadamente deteriorada en las ratas viejas, pero mejoraba en las jóvenes (Sirviö y cols, 1991).

Las lesiones con DSP-4 pueden agravar las deficiencias en la adquisición inducidas por escopolamina en la tarea del water-maze en ratas jóvenes, aunque no afectan la adquisición en las ratas control (Riekkinen y cols, 1990). Así, es posible que la deplección parcial de noradrenalina empeore el uso de algunas estrategias de aprendizaje que no están interrumpidas por la disfunción colinérgica o el envejecimiento, pero son importantes para

las ratas jóvenes tratadas con escopolamina o en las ratas viejas, para la solución de tareas de navegación espacial (Whishaw, 1985). Se ha sugerido que lesiones de la banda noradrenérgica dorsal afectan únicamente a la atención espacial en ratas adultas (Warren y cols, 1989; Selden y cols, 1990).

Los datos referentes a las modificaciones de los receptores α con la edad son contradictorios. Es posible que si se distingue entre los distintos tipos de receptores α pre y postsinápticos, se encuentre el patrón de cambios con la edad (Docherty y Hyland, 1986). Parece que podría haber una sensibilidad disminuida de los receptores α_2 presinápticos, pero no de los α_1 -postsinápticos en las ratas viejas, al menos en términos de la inhibición de un agonista exógeno o a la respuesta fisiológica a un único estímulo (Docherty y O'Malley, 1983). La menor sensibilidad a la noradrenalina de los receptores α_2 presinápticos se esperaría que diera como resultado un aumento en la transmisión nerviosa y, si estos cambios tiene lugar en el hombre, podrían explicar en parte los niveles plasmáticos elevados para la noradrenalina durante la vejez. También parece disminuir la respuesta postsináptica mediada por receptores α_2 en viejos a nivel vascular, esto explicaría porque es más frecuente la hipotensión postural en los ancianos (Docherty y Hyland, 1986).

La síntesis de receptores α también está deteriorada con la edad. Parece ser que al envejecer disminuye la capacidad de síntesis proteica tanto en células aisladas como en miniprismas cerebrales. El hecho de que en el estado de equilibrio estacionario el número de receptores α no varíe con la edad, al menos en este tejido, puede sugerir que también hay una disminución del porcentaje de degradación de los receptores, paralelo a la disminución de su síntesis. Así, el recambio de la proteína receptora puede estar disminuido durante el proceso de envejecimiento (Zhou y cols, 1984).

En roedores la mayoría de los estudios parecen indicar descensos en el número máximo de sitios de fijación específica del [3 H]-prazosín en los animales viejos, sin que se modifique su constante de disociación del receptor α_1 -adrenérgico (Misra y cols, 1980; Greenberg y Weiss, 1983).

Dado que existe una deplección de catecolaminas en la corteza prefrontal de los primates ancianos (Goldman-Rakic y Brown, 1981), los agonistas α_2 -adrenérgicos podrían mimetizar la noradrenalina perdida. En contraste, los efectos de empeoramiento de la cognición de los agonistas α_2 podrían deberse a acciones de los fármacos sobre receptores presinápticos (Arnsten y cols, 1988).

Como es sabido los agonistas α_2 -adrenérgicos producen hipotensión, sedación (Dollery y cols, 1975) y mejoran las deficiencias cognoscitivas en diferentes especies animales (Hunt y cols, 1985; Haroutunian y cols, 1990; Schneider y Kovelowski, 1990). La mejoría cognoscitiva probablemente se produzca por acción sobre los receptores α_2 postsinápticos de la corteza prefrontal, probablemente del subtipo R_1 (Arnsten y Goldman-Rakic, 1985). Por el contrario, la capacidad para disminuir la presión arterial e inducir sedación o empeorar la ejecución cognoscitiva se asocia al subtipo R_2 (Arnsten y cols, 1988). La guanfacina produce mejoras cognoscitivas de larga duración sugiriendo una acción del fármaco en el sistema de segundos mensajeros (Arnsten y cols, 1988). En general, los agonistas α_2 -adrenérgicos inhiben la actividad adenilato ciclasa (Kuno y cols, 1990). Sin embargo, el agonista α_2 -adrenérgico, UK-14304 facilita la actividad adenilato ciclasa en neocorteza de rata, posiblemente por estimulación selectiva del subtipo R_1 (Pilc y Enna, 1986). Este agonista mejora la realización cognoscitiva de monos viejos a dosis bajas. Este efecto se bloquea con el antagonista α_2 -adrenérgico idazoxan (Arnsten y Leslie, 1991). En este mismo estudio se constata que cuanto mayor es la diferencia entre las afinidades por los subtipos R_1 y R_2 , mayor es la separación entre las dosis que mejoran la memoria y las dosis que inducen sedación y disminución de la presión arterial. Cuanto más selectivo es un agonista por el sitio R_1 mayor será la dosis que se podrá usar para aumentar la memoria. Por tanto, un buen predictor de la efectividad de estos fármacos será, más que el valor de su constante de inhibición frente a cada uno de los subtipos de receptores, la relación de afinidades por los sitios R_1 y R_2 (Arnsten y Leslie, 1991).

La mayoría de los receptores α_2 -adrenérgicos de membranas procedentes de cerebro de ratón, parecen encontrarse en el estado de alta afinidad para el agonista, ya que el número máximo de sitios de fijación, determinados como fijación específica de [3 H]-yohimbina y [3 H]-UK

14304, bajo las mismas condiciones experimentales, no son diferentes (Gelbmann y Müller, 1990). Las constantes de afinidad para ambos radioligandos no varían en el curso del envejecimiento normal y son similares en los cerebros de ratones jóvenes y viejos. Además el número máximo de receptores α_2 -adrenérgicos determinados por la fijación específica de la [3 H]-yohimbina no es distinto entre animales jóvenes y viejos (Gelbmann y Müller, 1990). Sin embargo, en el cerebro de ratones viejos se encontró una disminución significativa de aproximadamente el 30% de los sitios de fijación de alta afinidad para el agonista, que varían desde el 90% presente en los jóvenes hasta el 69% de los viejos. Esto podría explicar las disfunciones de la neurotransmisión noradrenérgica central relacionadas con la edad (Arnsten y Goldman-Rakic, 1987; Davis y cols, 1988). También podría explicar los efectos beneficiosos del tratamiento con agonistas α_2 -adrenérgicos, como la clonidina, en la realización de tareas cognoscitivas en animales viejos, pero no en los jóvenes (Arnsten y Goldman-Rakic, 1985 y 1987; Joly y Sanger, 1988).

Por otra parte, en conducto deferente de rata vieja parece haber una disminución de la sensibilidad de los receptores α_2 -adrenérgicos a la noradrenalina y en consecuencia aumenta la transmisión de estos nervios (Docherty y O'Malley, 1985).

Parece ser que, en general, los receptores β disminuyen con la edad. En corteza cerebral los datos son poco claros, aunque parece que la densidad de receptores no varía. Cross y cols (1984) observaron que aparentemente la fijación con radioligandos al adrenoceptor β no está alterada en el hipocampo de los enfermos de Alzheimer.

Como ya hemos visto, parece existir una disminución de los receptores β con la edad. Además hay deficiencias para la recuperación de la densidad de receptores β en tejido cerebral de ratas viejas después de producir una denervación (Weiss y cols, 1980), o tras producir una regulación a la baja por administración repetida de desmetilimipramina. Esto indicaría que la síntesis de receptores β puede empeorar con la edad. Así se explicaría la pérdida de estos receptores en determinadas áreas cerebrales con la edad (Greenberg y Weiss, 1983).

Se ha postulado que la desensibilización de los receptores β puede dar lugar a un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa cuando el enzima es estimulado por agentes que actúan lejos del receptor como el NaF, [Gpp(NH)p] o forskolina, en una preparación (membranas) donde el acoplamiento receptor-adenilato ciclasa es bajo (Vetulani y cols, 1976; Bergstrom y Kellar, 1979).

Las ratas adultas sufren procesos de regulación a la baja de la misma manera que las jóvenes, sin embargo, no son capaces de regular al alza. Ésto sugiere defectos en la síntesis o regeneración de los adrenoceptores α (Zhou y Weiss, 1984) y β (Greenberg, 1986) con la edad.

Así pues, la innervación noradrenérgica del cerebro anterior parece actuar en concierto con las neuronas colinérgicas, dado que la destrucción de este sistema aumenta la sensibilidad a la escopolamina en ratas con deplección de la innervación colinérgica cortical (Sahgal y cols, 1990). Everitt y cols (1990) arguyeron que el sistema noradrenérgico del locus coeruleus/corteza cerebral puede tener un papel muy importante en los procesos cognoscitivos y de memoria, vía el control del ánimo y esto podría tener gran relevancia en la demencia.

Los resultados de dos estudios en los cuales los agonistas α_2 -adrenérgicos, clonidina y guanfacina, administrados a dosis bajas en monos viejos, mejoraban las tareas de respuesta retardada, ofreciendo apoyo a que el reemplazo noradrenérgico directo puede ser beneficioso en la demencia. Sin embargo, esto no se ha demostrado todavía. En un pequeño estudio doble ciego realizado con 8 pacientes de Alzheimer, se sugiere que no hay mejorías cognoscitivas en respuesta a la clonidina ni después de administrar dosis que causan efectos adversos (Mohr y cols, 1989).

3. OTROS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN CENTRALES

La relevancia clínica de las anormalidades en los sistemas de neurotransmisión catecolaminérgicos centrales no está clara. Se han descrito alteraciones en los sistemas

serotoninérgico y dopaminérgico del sistema nervioso central. La participación de cada uno de ellos, sin embargo no está bien establecida.

En general, parece que los tratamientos diseñados para aumentar la función serotoninérgica tienden a empeorar la memoria. Además los antagonistas de la serotonina y la deplección neurotóxica de este neurotransmisor en el hipocampo pueden aumentar la cognición. Sin embargo, bloqueadores putativos de la recaptación de serotonina han demostrado que mejoran el aprendizaje y la memoria. A pesar de que existen claras indicaciones de interacción serotonina/acetilcolina, permanece poco claro si estos sistemas neuronales se antagonizan o se potencian.

La administración de inhibidores de la recaptación de serotonina o de un precursor de este neurotransmisor puede potenciar la acción de los agonistas muscarínicos y aliviar el deterioro de la adquisición y la retención en el test de evitación activa, producida por la escopolamina (Hunter, 1989).

Por otra parte la deplección neurotóxica de serotonina del prosencéfalo aumenta los problemas de aprendizaje y memoria causados por lesión de las vías colinérgicas septo-hipocámpicas, a pesar de que la medida de los niveles o de la liberación de acetilcolina o serotonina indican que los dos sistemas son mutuamente inhibitorios (McEntee y Crook, 1991). Posiblemente pueda ser el balance entre la neurotransmisión serotoninérgica y colinérgica (y posiblemente serotoninérgica y noradrenérgica) el que es significativo sobre la cognición y la memoria, más que los niveles de los sistemas individuales.

Se han apreciado aumentos en los niveles de serotonina en distintas áreas del cerebro de ratas viejas, como son la corteza fronto-parietal y el hipocampo. Sin embargo, en otras regiones, como el complejo caudado-putamen, no se observan estas alteraciones. Por otra parte, también se ha visto que en estos mismos animales se reduce la densidad de fibras serotoninérgicas, especialmente en el hipocampo y corteza fronto-parietal (Van Luijcklaar y cols, 1992). Esto podría indicar un aumento de la síntesis o una disminución de la degradación de la serotonina, relacionada con el envejecimiento.

En el caso del sistema dopaminérgico mesocortical, a pesar de que parece claro que este sistema juega un papel importante en las deficiencias cognoscitivas asociadas a la enfermedad de Parkinson, existen pocos datos que apoyen la implicación de la dopamina en la enfermedad de Alzheimer.

Se ha sugerido una alteración funcional de los receptores dopaminérgicos D_1 en la enfermedad de Alzheimer (De Keyser y cols, 1990). A pesar de que el número total de receptores D_1 es similar en la corteza frontal de pacientes con Alzheimer y en los controles, hay una disminución significativa de los sitios de alta afinidad en el grupo enfermo (18% en enfermos de Alzheimer, frente a 35% en controles). Este estado de alta afinidad por el receptor se genera durante la interacción entre el agonista, el receptor y la proteína G.

A pesar de que se ha inferido que los sistemas de aminoácidos excitatorios presinápticos están involucrados en la enfermedad de Alzheimer, sus respectivos receptores parecen estar estructuralmente intactos y su concentración en áreas como el hipocampo y la corteza, afectadas en la demencia, indicarían que podrían ser unos buenos objetivos anatómicos para la terapéutica. Hay evidencias de que los receptores NMDA, AMPA y del subtipo metabotrópico se relacionan con los fenómenos de potenciación a largo plazo, donde la excitación inicial de vías neuronales, característicamente en el hipocampo, pueden aumentar subsecuentemente la transmisión (Izquierdo, 1991). Este proceso se cree que es un componente probable del aprendizaje y el almacenamiento de memoria.

Además la posible implicación de estos sistemas de neurotransmisión se ve reforzada por el hecho de que en la enfermedad de Alzheimer los efectos tóxicos de los aminoácidos excitatorios están facilitados por la proteína β -amiloide (Koh y cols, 1990).

Por otra parte, en el hipocampo de ratas que han sufrido lesiones de la corteza entorrinal y en pacientes de Alzheimer, que mostraron patologías extensivas de esta región cerebral, se observó un aumento de la fijación del kainato asociada con un aumento de la descarga axonal de las neuronas supervivientes (Geddes y cols, 1985). A pesar de que este descubrimiento no se confirmó en otro estudio con pacientes de Alzheimer (Represa y cols, 1988), en ellos

el ARN mensajero del receptor kainato/AMPA estaba aumentado en el subculiculum y en el área CA4 del hipocampo (Harrison y cols, 1990).

Estudios histológicos y neurofarmacológicos sugieren que los péptidos pueden estar ligados a la transmisión colinérgica en particular con neuronas que contienen acetilcolina, posiblemente modulando su liberación o viceversa, siendo su liberación modulada por receptores de la acetilcolina. La galanina, un péptido que en animales se localiza parcialmente con la acetilcolina en células de los núcleos prosencefálicos de la base y que inhibe la liberación de acetilcolina en el hipocampo, se preserva en el hipocampo de los pacientes de Alzheimer (Ikeda y cols, 1991).

4. ALTERACIONES DE LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL

Para evaluar completamente el significado de las alteraciones en el funcionamiento de los neurotransmisores durante la demencia y para predecir la eficacia de la terapia relacionada con neurotransmisores, se debe evaluar la señal transmembrana del receptor en la demencia. Además del número de células, las alteraciones de los mecanismos moleculares pueden modificar los procesos bioquímicos de la respuesta celular. Como los sistemas de transducción se componen de varias unidades (Neer y Clapham, 1988) la supresión del efecto de la edad puede estar presente a cualquier nivel de la cadena de transducción.

Los receptores a los neurotransmisores son, o bien parte de un complejo transmembrana polimérico, el cual forma un canal iónico que se dispara por un ligando (glutamato, GABA, nicotínico), o bien interaccionan con proteínas G (noradrenalina, serotonina, histamina, muscarínico) la cual a su vez reacciona con moléculas efectoras tales como la adenilato ciclasa o la fosfolipasa C, que modulan los niveles celulares del segundo mensajero: AMP cíclico o trifosfato de inositol más diacilglicerol. Existen algunas indicaciones de que las deficiencias en la transmisión neuronal durante la demencia no se limitan a los niveles de neurotransmisor o de sus receptores, sino que se prolongan en el funcionamiento de los receptores cerebrales, el acoplamiento a proteínas G y la síntesis de segundos mensajeros.

La medida de receptores *in vitro*, por marcaje radiactivo o inmunohistoquímico, no da indicaciones del estado funcional del receptor o de su capacidad para desencadenar la cascada de segundos mensajeros. Sin embargo, la fijación con ligandos específicos que se unen a un sitio del canal iónico que únicamente es accesible cuando el canal está en la conformación abierta, se ha usado para dar una indicación de la capacidad de agonistas y antagonistas para abrir y cerrar el canal acoplado al ligando.

Utilizando [^3H]MK-801, un antagonista de los receptores NMDA, en homogeneizados de membranas de corteza cerebral, Procter y cols (1989) encontraron que la capacidad del glutamato para abrir el canal asociado al receptor NMDA, está preservada en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, se observa una menor respuesta celular al coagonista glicina en la corteza frontal de los enfermos de Alzheimer. Desafortunadamente no se ha podido aplicar esta aproximación al receptor nicotínico, seguramente por su escaso número en la corteza cerebral y por su rápida desensibilización (Court y cols, 1990).

McLaughlin y cols (1991) midieron los niveles de la subunidad α de la proteína G_i ligada a la adenilato ciclasa y de la G_o (proteína G sin una función asignada) y no encontraron modificaciones ni en la corteza frontal ni en el hipocampo de los enfermos de Alzheimer. El ARN mensajero de la subunidad α de la G_i se ha descrito que está aumentado en hipocampo y corteza temporal, pero no en tejido procedente del cerebelo de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, éste también era el caso de un grupo mixto de pacientes dementes, no del tipo Alzheimer, por lo que la interpretación de los datos es complicada por los efectos tan profundos y variables que provocan los estados agónicos en los niveles individuales de ARN mensajero (Harrison y cols, 1991a,b).

Se ha descrito que los niveles basales de AMP cíclico y la actividad adenilato ciclasa no varían en el cerebro con la edad, particularmente no es así para corteza cerebral ni para hipocampo (Schmidt y Thornberry, 1978). Sin embargo, empleando homogeneizados de hipocampo procedentes de pacientes de la enfermedad de Alzheimer, sugiere un deterioro de la producción de AMP cíclico basal, así como de su acumulación después de estimular con isoprenalina, en comparación con el grupo de valores control (Ohm y cols, 1989).

La activación de la adenilato ciclasa con GTP, NaF o manganeso no se modifica con la edad, sugiriendo la integridad del enzima a lo largo de la vida (Rabin, 1986). Sin embargo, la actividad adenilato ciclasa puede verse limitada por la disponibilidad de receptores. Alternativamente podría explicarse la modificación de la formación de AMP cíclico por la existencia un defecto en el acoplamiento receptor-adenilato ciclasa (Scarpace y Abrass, 1986).

También se ha sugerido un deterioro de la producción de AMP cíclico en repuesta a la forskolina, en los enfermos de Alzheimer. Este fármaco estimula la actividad adenilato ciclasa directamente a concentraciones micromolares e interacciona con la G_s -adenilato ciclasa a concentraciones nanomolares (Seamon y cols, 1981). Esta deficiencia podría indicar la posibilidad de una disminución en la actividad de la adenilato ciclasa o en la interacción G_s -adenilato ciclasa en la enfermedad de Alzheimer.

A pesar de que los descubrimientos de Danielsson y cols (1988) no apoyan esto, se han encontrado disminuciones en los sitios de alta afinidad para la [3H]-forskolina, en la corteza frontal (pero no en la temporal) de pacientes con Alzheimer en comparación con controles de edad similar (Dewar y cols, 1990). Danielsson y cols (1988) observaron que en pacientes de Alzheimer la actividad basal de la adenilato ciclasa era significativamente mayor en el hipocampo, mientras que la estimulación de la adenilato ciclasa con el péptido intestinal vasoactivo o con forskolina no se diferenciaba de los controles. Sin embargo, el hecho de que estos autores usaran en sus experimentos un débil inhibidor de la fosfodiesterasa, como es la teofilina (1 mM), que puede no ser suficiente para bloquear la degradación del AMP cíclico durante el proceso de incubación de 15 minutos, podría explicar porque no se apreciaron modificaciones de los niveles de AMP cíclico.

Estos cambios se observan también en tejidos periféricos. Con la edad en el pulmón se producen cambios en el sistema de transducción β -adrenérgico: hay aumentos en la densidad de receptores y disminuciones en el porcentaje de sitios de alta afinidad para el agonista y en consecuencia no se modifica la síntesis de AMP cíclico promovida por agonistas (Vanscheeuwijck y cols, 1989). En el pulmón de la rata predomina el subtipo β_2 (Barnett y

cols, 1978) mientras que en riñón es mayoritario el β_1 (Brodde, 1982; Michel y *cols*, 1987). En las ratas adultas la actividad adenilato ciclasa está aumentada en el riñón. Tras la estimulación con GTP, [Gpp(NH)p] y forskolina el aumento neto era mayor en animales viejos. Esto no es así para el NaF (Vanscheeuwijck y *cols*, 1990).

A pesar de que existen alteraciones a diferentes niveles de la cadena, la estimulación con agonistas da lugar a una síntesis de AMP cíclico comparable en jóvenes y viejos. Esto sugiere que los mecanismos homeostáticos permanecen activos con la edad en pulmón de rata (Vanscheeuwijck y *cols*, 1989). En los animales viejos, y en el riñón, la densidad de receptores se dobla y la afinidad por el sitio de fijación es la mitad. Además, en los animales viejos disminuye el porcentaje de sitios de alta afinidad para el agonista isoprenalina. Sin embargo, las diferencias observadas en la producción de AMP cíclico estimulada por agonistas en los dos grupos de edad, es probablemente de importancia limitada (Vanscheeuwijck y *cols*, 1990).

Como ya se ha comentado, la estimulación de los receptores ligados a la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bis-fosfato genera inositol 1,4,5-trifosfato (que libera calcio de los depósitos intracelulares) y diacilglicerol (que activa la protein kinasa C) (Berridge e Irvine, 1984; Huang, 1989). Existen indicaciones de deterioro en esta cascada de señales durante la enfermedad de Alzheimer. Por un lado tenemos que el nivel de fosfoinosítido, un precursor del fosfatidilinositol-4,5-bis-fosfato está disminuido en la corteza temporal de los enfermos de Alzheimer (Stokes y Hawthorn, 1987).

Por otra parte, los receptores α_1 -adrenérgicos de la corteza cerebral de ratas viejas están acoplados más eficientemente a la hidrólisis de fosfoinosítidos, como se observa por la menor concentración eficaz 50 de la noradrenalina para la estimulación de la formación de fosfatos de inositol (Miyamoto y *cols*, 1990). Una posible explicación al aumento en la formación de fosfatos de inositol, asociada a una disminución de los sitios de fijación, sería un cambio en la estequiometría del receptor, la proteína G y/o la fosfolipasa C con la edad. Así, una mayor proporción de fosfolipasa C podría ser activada por la interacción de un solo receptor con la proteína G, en membranas de corteza cerebral de ratas adultas (Litosch, 1987).

En la corteza parietal de los enfermos de Alzheimer, el trifosfato de inositol parece estar disminuido un 50-70%. Sin embargo, no se han detectado pérdidas en otras regiones cerebrales, como son la corteza frontal, occipital o temporal, el núcleo caudado o la amígdala (Young y cols, 1988).

Cole y cols (1988) observaron que el sitio diana del diacilglicerol, la protein kinasa C, también se encontraba disminuida, aproximadamente un 50% en la corteza frontal de enfermos de Alzheimer. Sin embargo, esto no se ha confirmado en un estudio más reciente, en el cual la pérdida de fijación del [^3H]-12,13-dibutirato de forbol en homogeneizados de secciones de tejidos de hipocampo y corteza (temporal y frontal) no se detecta para enfermos de Alzheimer (Horsburgh y cols, 1991).

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Es importante considerar que el envejecimiento normal, por sí mismo, resulta en una pérdida significativa de la actividad de algunos neurotransmisores, por ejemplo la acetilcolina, especialmente en áreas tales como el hipocampo. Esta pérdida da lugar a un deterioro global, aunque no detectable, de las funciones cognoscitivas, pero que bien puede ser responsable de los deterioros menores de memoria asociados con la edad. Estas deficiencias resultan mucho más evidentes en los casos de demencia.

1. TERAPIA COLINÉRGICA

Los sujetos ancianos pueden mostrar empeoramientos en la memoria a corto y largo plazo (Pontecorvo y cols, 1988; Arnsten y Goldman-Rakic, 1990; Bartus y Dean, 1990). La formación hipocámpica juega un importante papel en la memoria representacional y su disfunción puede contribuir a las deficiencias de aprendizaje/memoria espacial observadas en ratas viejas (Barnes, 1988; Gallagher y Pellemounter, 1988).

Se han empleado cuatro estrategias en un intento por corregir esta deficiencia de acetilcolina, a saber, 1) administración del precursor, 2) administración de agonistas nicotínicos y muscarínicos, 3) inhibidores de la acetilcolinesterasa (fisostigmina y tacrina), 4) combinación de precursores e inhibidores de la acetilcolinesterasa. Una terapia paliativa práctica para la enfermedad de Alzheimer deberá aliviar la carga diaria que sufren los cuidadores de estos enfermos o enlentecer la progresión del mal, previniendo el rápido desencadenamiento de la dependencia e incapacidad.

El tratamiento de los pacientes con precursores, como colina o fosfatidilcolina (lecitina), se realizó asumiendo que un aumento de la disponibilidad del precursor conduciría a un incremento de la síntesis y eventualmente de la liberación de acetilcolina. Sin embargo, los estudios han puesto de manifiesto que el tratamiento con precursores resulta inefectivo (Bartus y cols, 1982). Ni siquiera cuando el tratamiento se prolonga durante un año o más se observan resultados positivos (Levy y cols, 1983; Little y cols, 1985).

Durante muchos años, los clínicos y científicos han estado buscando reemplazar los neurotransmisores perdidos en la demencia, de forma análoga a la administración de L-Dopa en la enfermedad de Parkinson. Parece que pese a que la terapéutica colinérgica no ha sido muy exitosa, pueden haber indicios que favorecen este aspecto de la investigación. Los pacientes de Alzheimer pueden ir deteriorándose durante años, sin embargo, ahora parece que este progreso podría ser frenado con una terapia adecuada (Court y Perry, 1991).

Una gran iniciativa terapéutica en los últimos 10 años ha incluido el uso de agonistas muscarínicos. Este tratamiento resulta racional en vista del malfuncionamiento de las neuronas colinérgicas en la demencia y la aparente preservación de los receptores muscarínicos, además de los bien establecidos efectos pneumotécnicos de los fármacos muscarínicos (Dunnett y cols, 1991). Los agonistas arecolina, betanecol, oxotremorina y RS86 (bromhidrato de 2-etil-8-metil-2,8-diazoespiro-4,5-decan-1,3-diona) se han usado en una serie de ensayos con pacientes de Alzheimer con resultados algo controvertidos (Gray y cols, 1989).

La administración intravenosa de arecolina en ensayos doble ciego, provoca una mejoría en la realización del test de reconocimiento de fotografías, pero no en otros test de memoria o aprendizaje; además a dosis altas provoca retraso psicomotor (Christie y cols, 1981; Tariot y cols, 1988).

En otros estudios en los que se administra betanecol directamente en los ventrículos cerebrales para minimizar los efectos adversos periféricos, no se observaron signos de mejoría de la memoria, sin embargo, sí que se pudieron observar mejorías del movimiento e incluso del comportamiento en algunos pacientes (Penn y cols, 1988; Wilson y Martin, 1988).

En contraste, en un ensayo doble ciego, empleando oxotremorina por vía oral con siete pacientes con síntomas de probable enfermedad de Alzheimer, cinco desarrollaron síntomas graves de depresión, lo que es compatible con la teoría de la hiperactividad colinérgica en la depresión (Davis y cols, 1978).

Ensayos realizados con RS86 administrado oralmente, sugieren pequeñas o ninguna mejoría de la ejecución cognoscitiva y del comportamiento en algunos pacientes (Hollander y cols, 1987; Mouradian y cols, 1988). Sin embargo, el fármaco causó una amplia variedad de efectos adversos como sudoración, aumento de la salivación, síncope, dolor abdominal y angina, impidiendo su uso en muchos pacientes. Esto dificulta, por tanto, su utilización como agente terapéutico.

Diferentes estudios ponen de manifiesto que, en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, también podrían tener utilidad los fármacos que estimulan los receptores nicotínicos. Esto es así porque los receptores nicotínicos presinápticos están situados en neuronas dopaminérgicas y colinérgicas de la corteza cerebral y el hipocampo. Se ha visto que la estimulación *in vitro* de estos receptores estimula la liberación de neurotransmisores (Rowell y Winkler, 1984; Rapier y cols, 1988) e inhibe la recaptación de dopamina en el estriado (Izenwasser y cols, 1991).

En diferentes estudios clínicos, se ha observado que a determinadas dosis la inyección intravenosa de nicotina mejora la atención en la enfermedad de Alzheimer. Además se ha observado que fumar cigarrillos tiene un efecto protector contra la enfermedad de Alzheimer, retrasando la aparición de los síntomas una media de seis años en los casos preseniles (Van Duijn y Hofman, 1991).

Sin embargo, la terapia con agonistas puede ser menos apropiada que la terapia anticolinesterásica, ya que los receptores podrían estar expuestos a niveles constantes de agonistas, lo que puede tener distintas consecuencias fisiológicas en la liberación natural de agonista por las terminales nerviosas. Aumentar la acción del agonista liberado naturalmente por un inhibidor de la acetilcolinesterasa, parece que restablecerá la funcionalidad con mayor probabilidad.

Las enzimas acetil y butirilcolinesterasa parecen estar secuestrados en las placas y ovillos del cerebro de los pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Mesulam y cols, 1987). Además de su actividad esterásica estas enzimas son potentes proteasas. Estos autores sugieren que su acción proteolítica puede transformar un precursor amiloide neuronal o circulante en la subunidad insoluble encontrada en las placas y ovillos. Alternativamente, esta actividad podría contribuir a los cambios degenerativos de las proteínas del citoesqueleto y así conducir a la formación de placas y ovillos. La síntesis proteica está también involucrada en la formación de la memoria, así una función anormal de una proteasa podría interrumpir este proceso. Si estas especulaciones son correctas entonces los inhibidores de la acetilcolinesterasa podrían detener el progreso de la enfermedad de Alzheimer. A parte de esto, está claro que la distribución de la esterases es anormal en los cerebros enfermos, y ésto podría afectar su acción sobre la hidrólisis de acetilcolina. Sin embargo, el aumento del efecto de la acetilcolina liberada naturalmente por la tacrina debe ser una parte importante de su acción.

El hecho de que la acetilcolinesterasa esté disminuida en la enfermedad de Alzheimer sugiere que, con una dosificación apropiada, los inhibidores de la acetilcolinesterasa pueden ser selectivamente efectivos en las áreas cerebrales afectadas. Los resultados obtenidos con

experimentación animal han demostrado los efectos potencialmente beneficiosos de los inhibidores de la acetilcolinesterasa.

Entre los ensayos clínicos con pacientes de Alzheimer aquellos que usan inhibidores de la acetilcolinesterasa son los que demuestran mejores resultados. Sin embargo, las mejorías de memoria y cognición en estos pacientes es muy limitada.

La fisostigmina es un inhibidor de la acetilcolinesterasa reversible utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En el rango de dosis toleradas por la mayoría de los pacientes, la fisostigmina inhibe aproximadamente un 25% de la acetilcolinesterasa plasmática y aproximadamente un 11% de la acetilcolinesterasa eritrocitaria a los 60 minutos de la ingesta (Sherman y Messamore, 1988).

Hallak y Giacobini (1986) detectaron aumentos de 2-3 veces la concentración de acetilcolina en cerebros de ratas tratadas con fisostigmina. Si estos pequeños aumentos son los que se dan en los pacientes, no serán suficientes para restablecer la función colinérgica (Thal y cols, 1988).

La administración oral de fisostigmina por un plazo largo de tiempo (Stern y cols, 1988; Thal y cols, 1989; Harrell y cols, 1990), puede mejorar la memoria y las pruebas de comportamiento de la enfermedad de Alzheimer, a pesar de que la administración aguda no lo hace (Jenike y cols, 1990).

La fisostigmina produce efectos adversos incómodos y discapacitantes que limitan el rango terapéutico útil. Estos efectos incluyen náuseas, vómitos, diarrea, debilidad muscular, broncoespasmo, bradicardia y convulsiones.

Se cuestiona, la utilidad terapéutica de la fisostigmina, ya que este fármaco únicamente produce mejorías significativas que se restringen a tareas particulares cuando los pacientes son dosificados cada 2-3 horas. Además, sólo algunos pacientes muestran mejorías clínicas. Por otra parte, la fisostigmina tiene un margen terapéutico estrecho y una acción muy corta.

A la vista de estos datos podemos afirmar que el potencial terapéutico de la fisostigmina se encuentra comprometido por distintos factores, como son su semivida biológica demasiado corta, la ausencia de mejorías clínicamente significativas de la memoria o de las actividades de la vida cotidiana y la presencia de efectos adversos discapacitantes a las dosis necesarias para demostrar eficacia en la disfunción memorística (Kumar y Becker, 1989).

1.1. Tacrina

La tacrina fue sintetizada por primera vez en 1945 por Albert y Gledhill. Los estudios sobre su farmacología condujeron a su uso en muchas situaciones clínicas. Por ejemplo Shaw y Bentley (1949, 1952) describieron que la tacrina antagonizaba la narcosis producida por morfina en el perro, probablemente porque altera el patrón de degradación metabólico de la morfina (Woo y cols, 1968; Heymans y cols, 1971). Como también antagoniza la depresión respiratoria y la sedación causada por este opiáceo, permite su uso en dosis mayores para controlar el dolor canceroso (Shaw y Shulman, 1955; Stone y cols, 1961).

La más reciente sugerencia indica la posible utilidad de la tacrina para aliviar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (Summers y cols, 1986; Kumar, 1988) lo cual ha renovado el interés por este fármaco, dado que la demencia senil del tipo Alzheimer se está mostrando como probablemente el mayor problema público de la población de edad. Summers y cols, (1986, 1988) alcanzaron cierto éxito utilizando un tratamiento combinado de tacrina más lecitina. Dado que presenta cierta hepatotoxicidad que limitará su uso en algunos pacientes, mientras que en otros los efectos colinérgicos periféricos pueden reducir la dosis adecuada (Summers y cols, 1989), será muy útil revisar la farmacología de la tacrina en un intento por definir cual de sus acciones está relacionada con esta mejoría parcial de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer.

En principio se describió la tacrina como un potente anticolinesterásico (Shaw y Bentley, 1953). Heilbronn publicó en 1961 que la tacrina era un inhibidor más potente de la butirilcolinesterasa. Las diferentes formas de acetil y butirilcolinesterasa en el cerebro de la rata varían en su afinidad por la tacrina. Las diferencias en la selectividad pueden ser una

función de la concentración de sustrato. Existe una falta de acuerdo fundamental en la literatura, sobre el tipo de inhibición de la acetilcolinesterasa causada por la tacrina. En el sitio de actividad catalítica de la acetilcolinesterasa existen dos subsitios, el uno es un sitio aniónico que une el grupo trimetilamonio de la acetilcolina, y el otro, el sitio esterásico, actúa como nucleófilo uniéndose al grupo carbonilo del éster. Roufogalis y Quist (1972) denominaron al sitio aniónico del centro activo como el sitio α -aniónico, e identificaron dos sitios alostéricos periféricos aniónicos llamados β y τ . Patocka y cols (1976) razonaron que dado que la tacrina es un inhibidor de la acetilcolinesterasa no competitivo no podría unirse al sitio α -aniónico. También eliminaron el sitio β -aniónico en base a experimentos cinéticos, realizados en presencia de tacrina y calcio. Finalmente concluyeron que la tacrina debía unirse al sitio τ -aniónico. En contraste, Steinberg y cols (1975) y Wu y Yang (1989) postularon que el sitio de unión de la tacrina era un área hidrofóbica, conformacionalmente flexible muy cercana al sitio α -aniónico.

Nielsen y cols en 1989 encontraron que la tacrina se distribuía rápidamente en el cerebro alcanzando concentraciones en el sistema nervioso central que normalmente excedían 8-12 veces las plasmáticas. Ellos sugieren que la acetilcolinesterasa podría estar inhibida al menos el 80-90% durante la primera hora después de inyectar $3.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de tacrina. Por otra parte la inyección de dosis de $5-10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ causa aumentos importantes de los niveles de acetilcolina en el núcleo estriado, hipocampo y corteza fronto-parietal. Sherman y Messamore (1988) por el contrario, encontraron que los niveles de inhibición de la acetilcolinesterasa eran similares en cerebro y plasma después de administrar dosis parecidas de tacrina, sugiriendo que la acumulación de tacrina en el cerebro no parece conducir a niveles superiores de inhibición de la acetilcolinesterasa que los alcanzados en periferia.

Después de la primera inyección intramuscular de tacrina ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) Hallak y Giacobini (1989) observaron una inhibición de la acetilcolinesterasa cerebral con aumentos concordantes de la acetilcolina (aproximadamente del 70%). Una segunda dosis ($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) administrada seis horas después, cuando los niveles de acetilcolinesterasa se habían recuperado parcialmente y los niveles de acetilcolina volvían a ser normales, provocaba la inhibición de la acetilcolinesterasa hasta unos niveles comparables a los observados después de la primera

dosis de tacrina, mientras que los niveles de acetilcolina no aumentaban. Sin embargo, cuando se administraba fisostigmina la segunda dosis sí da lugar a aumentos de la acetilcolina, hasta unos niveles próximos a los alcanzados después de la primera dosis. Los autores excluyeron un efecto directo de la tacrina sobre el enzima biosintético, acetilcolintransferasa, como una explicación de los resultados y tentativamente propusieron que la tacrina bloqueaba la liberación de acetilcolina provocando un aumento de la acetilcolina intracelular que temporalmente impediría la síntesis del neurotransmisor. Hodges y cols (1990) encontraron que el tratamiento crónico con tacrina no afecta significativamente el contenido de acetilcolina en varias regiones cerebrales de la rata, ni siquiera cuando el régimen de tratamiento era efectivo a nivel comportamental.

Las propiedades anticolinesterásicas de la tacrina constituyen la base de su acción para prolongar la relajación muscular causada por succinilcolina. La tacrina, sin embargo, no es un inhibidor de la acetilcolinesterasa ni tan potente ni tan específico como la fisostigmina. Su afinidad por esta enzima es menor en un orden de magnitud. Por otra parte, es un inhibidor más potente de la pseudocolinesterasa (butirilcolinesterasa) que de la acetilcolinesterasa (Heilbronn, 1961; Ho y Freeman, 1965).

Freeman y Turner (1970) estudiaron la interacción entre la tacrina y la succinilcolina en la preparación de nervio frénico-diafragma aislado de rata. En esta preparación en la que no hay hidrólisis por la pseudocolinesterasa plasmática, la tacrina antagoniza el bloqueo de la transmisión causada por succinilcolina. Por otra parte, la tacrina facilita la transmisión neuromuscular y causa actividad espontánea; estos efectos son antagonizados por dosis bajas de succinilcolina. Gershon y Shaw (1958) demostraron que la tacrina tenía un efecto anticurarizante en el hombre y en los animales de experimentación. Este mismo efecto se vió también *in vitro* (Rees, 1966) a pesar de que la tacrina es menos efectiva como inhibidor de la acetilcolinesterasa que la neostigmina.

Fisostigmina, 3,4-diaminopiridina y tacrina aumentan la transmisión colinérgica en el músculo esquelético (Harvey y Rowan, 1990) por distintos mecanismos. La fisostigmina no afecta las corrientes neuronales o la liberación evocada de acetilcolina, pero la 3,4-

diaminopiridina a concentraciones $0.5 \mu\text{M}$ y superiores disminuye la porción dependiente del potasio que facilita la liberación de acetilcolina en la terminación nerviosa. A concentraciones de tacrina $100\text{-}200 \mu\text{M}$ la onda se prolonga. La tacrina parece tener actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa y actividad facilitadora presináptica en el mismo rango de concentraciones. De todas formas las sinapsis periféricas pueden no ser un modelo adecuado para estudiar el sistema nervioso central.

De la Lande y Bentley (1955) encontraron que la tacrina inhibía la acetilación de la colina en gran número de preparaciones celulares de cerebro de rata. Este efecto es compartido por la fisostigmina. Sin embargo, ninguna de estas sustancias inhibe la acetilación en extractos cerebrales libres de células. Aquí parece intervenir otro efecto diferente de la inhibición de la acetilcolinesterasa y podría reflejar la capacidad de la tacrina para inhibir la recaptación de alta afinidad de la colina (Buyukuysal y Wurtman, 1989).

En esta misma línea, Sherman y Messamore (1988) describieron que cuando las ratas eran tratadas con $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de tacrina antes de ser sacrificadas, la recaptación de alta afinidad de colina en sinaptosomas hipocámpicos estaba inhibida aproximadamente un 30% con respecto al control. En corteza cerebral la disminución era del 20%. Además, el tratamiento crónico con tacrina (48-54 días) disminuía la recaptación de colina un 19% en hipocampo y un 12% en corteza cerebral. En estas condiciones, los efectos a largo plazo de la tacrina pueden no ser beneficiosos ya que aparentemente inhibe la recaptación de colina en las terminales nerviosas, llevando al uso y posible deplección de la colina intracelular para la síntesis de neurotransmisor (Dolezal y Tucek, 1991), por tanto su efectividad se verá limitada a menos que se administre conjuntamente con lecitina.

También se ha visto que la tacrina inhibe la liberación de acetilcolina *in vitro* en cerebros de rata y humanos (Loiacono y Mitcheson, 1990; Tucek y Dolezal, 1991), presumiblemente porque el aumento del nivel de la acetilcolina actúa sobre los autorreceptores M_2 .

La tacrina tiene una mayor afinidad por los receptores nicotínicos y muscarínicos (Perry y cols, 1988) que la demostrada por la fisostigmina. Pearce y Potter (1988) concluyeron que

la tacrina bloqueaba primariamente los sitios de los receptores M_1 y M_2 de hipocampo y tronco del encéfalo. Además, la tacrina también parece unirse alostéricamente a estos receptores.

En cuanto a la administración crónica de tacrina, se ha podido constatar que produce una regulación a la baja selectiva en el número de receptores M_1 . Flynn y Mash (1989) apreciaron, sin embargo, que la actividad acetilcolinesterásica permanecía inhibida en la corteza cerebral en la misma proporción a lo largo de todo el periodo de tratamiento con tacrina. Es posible que la tacrina no sea selectiva de los distintos subtipos de receptor M_1 (Potter y cols, 1989a). Por otra parte, el número de receptores M_2 parece no alterarse por el tratamiento crónico con tacrina (Sherman y Messamore, 1988).

Se conoce desde hace tiempo que los fármacos bloqueantes muscarínicos centrales pueden inducir un estado de delirio que mimetiza una psicosis. La escopolamina y la atropina causan este efecto que es más pronunciado con una serie de fármacos glicolatos que penetran rápidamente en el sistema nervioso central. Gershon (1960) describió que la tacrina abolía completamente los síntomas producidos por la N-etil-3-piperidil-2-ciclopentil-2-fenilglicolato en ratones. Los humanos, inyectados con 10-20 mg de glicolato muestran síntomas psicóticos que desaparecían con la inyección de 30-60 mg de tacrina.

Perry y cols (1988), notaron que la tacrina tendía a aumentar la hidrólisis de fosfoinosítidos en tejidos procedentes de corteza cerebral humana a concentraciones de 0.1 y 1 μM , en presencia o ausencia de carbacol. También inhibía fuertemente la hidrólisis de fosfoinosítidos estimulados por carbacol a concentraciones superiores. Este último efecto no se observó con fisostigmina y concuerda con la capacidad de la tacrina para desplazar la unión de ligandos muscarínicos. Estos autores sugieren que puede ser terapéuticamente relevante para bloquear el mecanismo de retroalimentación inhibitorio de la liberación de acetilcolina vía receptores presinápticos. Es posible que la actividad anticolinesterásica de la tacrina sea responsable del aumento de la hidrólisis de fosfoinosítidos a concentraciones bajas, previniendo la hidrólisis de acetilcolina endógena.

La tacrina tiene un perfil farmacológico complicado que hace difícil predecir el efecto neto que tendrá en las distintas sinapsis colinérgicas. Además de sus acciones sobre los receptores muscarínicos, presenta también importantes acciones sobre canales iónicos. Se relaciona estructuralmente con el bloqueante de los canales de sodio, 9-aminoacridina (Yamamoto y Yeh, 1984) y con el bloqueante de los canales de potasio, 4-aminopiridina (Freeman, 1979).

Osterreider (1987) demostró que la tacrina tenía propiedades bloqueadoras del canal de potasio en miocitos ventriculares aislados de cobayo. Realizando experimentos de voltage-clamp vió una inhibición de las corrientes de entrada rectificadoras y de salida retardada. Esto da como resultado un enlentecimiento del potencial de acción transmembrana. También se vió que la tacrina podía bloquear los canales de calcio. La inhibición de la corriente de salida de potasio era apreciable a una concentración de tacrina 1 μM , y aumentaba de manera dosis-dependiente, hasta el 72% a una concentración 100 μM . Castle y cols (1989) han sugerido que en corazón la tacrina bloquea los mismos canales de potasio modulados por la adenosina y los agonistas colinérgicos.

Drukarch y cols (1987) estudiando la *Lymanaea stagnalis* vieron que la tacrina no afectaba la corriente de entrada de potasio pero sí disminuía el estado estacionario de la corriente de salida de potasio, aumentando la duración de los potenciales de acción. Schauf y Sattin (1987) publicaron que la tacrina, aplicada interna o externamente bloqueaba los canales de potasio en axones de *Myxicola* con una constante de disociación de 100 μM . Concentraciones inferiores de tacrina en el rango micromolar, inicialmente enlentecen los canales conductores de sodio, con una disminución de la corriente de este ión durante los pulsos de despolarización que se vuelven bifásicos tras una exposición prolongada. Observaron que los efectos de la tacrina sobre los canales de sodio se parecían mucho a los de la galamina.

Stevens y Cotman (1987) examinaron la acción de la tacrina en las neuronas piramidales de cobayo usando registros intracelulares en preparaciones de miniprismas hipocámpicos. Sus resultados eran consistentes con una acción directa de la tacrina sobre los canales de potasio. Dado que la acomodación e hiperpolarización tardía persistían en presencia de tacrina, no parece que el bloqueo tenga lugar sobre los canales de potasio dependientes de calcio.

Halliwell y Grove (1989) mostraron que en neuronas hipocámpicas la tacrina bloqueaba efectivamente la conductancia de potasio inhibitoria generada por neurotransmisores. Ésta es una corriente de potasio de entrada que es activada por una proteína G unida entre el receptor ocupado por el neurotransmisor y los canales relevantes. La reducción por tacrina de estas conductancias inducidas por agonistas es independiente del tipo de receptor activado por el agonista. La naturaleza precisa de los canales de potasio bloqueados por la tacrina no está clara. Por lo visto, otros canales iónicos son sensibles a la tacrina y esto se puede aplicar más a tejidos nerviosos que al corazón. Sin embargo, todos los trabajos apuntan a una disminución en las corrientes de potasio producida por la tacrina. Es posible que los cambios de la permeabilidad de potasio inducidos por agonistas puedan ser más susceptibles de modulación por tacrina que otros canales de potasio. Esta modulación puede ser particularmente importante en el sistema nervioso central, donde se ha detectado modulación de los efectos de los receptores histaminérgicos (Reiner y McGeer, 1988) y serotoninérgicos, así como interacciones con los receptores de acetilcolina.

Para estudiar los efectos de la tacrina en situación donde los receptores de neurotransmisores y los canales iónicos no han perdido su relación normal, se han usado miniprismas y sinaptosomas cerebrales. La tacrina 50 μM produce una pequeña disminución de la liberación de acetilcolina estimulada eléctricamente, no significativa en corteza cerebral y en hipocampo (Loiacono y Mitcheson, 1990; Tucek y Dolezal, 1991). Potter y cols (1989b) consideraron que se debía a que receptores presinápticos se estimulaban por la acetilcolina acumulada en la hendidura sináptica después de la inhibición de la colinesterasa.

En este mismo sentido cabe esperar que el bloqueo por tacrina de los canales de potasio presinápticos tendiera a aumentar la liberación por enlentecimiento del potencial de acción en las terminales nerviosas. Si previamente se inhibe la acetilcolinesterasa con fisostigmina, para separar la acción bloqueante de los canales de la inhibición de la acetilcolinesterasa, se observa que la tacrina produce un pequeño e insignificante aumento de la liberación.

Parece ser que en pacientes de Alzheimer la tacrina estimula la liberación de acetilcolina (Nordberg y cols, 1989). En estos enfermos el balance de autorreceptores muscarínicos y

nicotínicos posiblemente está alterado. En este sentido se ha demostrado un efecto estimulador de la tacrina en la liberación de acetilcolina en miniprismas de cerebros de rata, donde los receptores inhibitorios muscarínicos y los α_2 -adrenérgicos están bloqueados (Loiacono y Mitcheson, 1990).

Nilsson y cols (1987) observaron en tejido humano control previamente marcado con [3 H]-colina, que la tacrina y la fisostigmina (100 μ M) disminuían significativamente la liberación de [3 H]-acetilcolina estimulada por potasio. Sin embargo, en tejidos procedentes de pacientes de la enfermedad de Alzheimer la liberación evocada de [3 H]-acetilcolina estaba significativamente disminuida en comparación con los controles. En presencia de tacrina o fisostigmina 100 μ M la liberación de [3 H]-acetilcolina aumentaba con respecto a los niveles control. El efecto facilitador de la fisostigmina podía ser parcialmente bloqueado por el antagonista nicotínico, d-tubocurarina 1 μ M. Finalmente, la atropina 10 μ M aumentaba la liberación de acetilcolina en tejidos control y en enfermos de Alzheimer.

La tacrina evoca asimismo, la liberación de serotonina y dopamina endógena en miniprismas de cerebro de rata (Robinson y cols, 1989). Concentraciones de tacrina 100 μ M provocan liberación de monoaminas comparable pero no aditiva con la liberación producida por potasio 35 mM. Esto sugiere que podría tener un efecto bloqueador de las corrientes de potasio insensibles a la 4-aminopiridina.

Drukarch y cols (1988) encontraron que la adición de tacrina al medio de perfusión inducía un aumento de la liberación de noradrenalina de larga duración en miniprismas de corteza fronto-parietal de rata. A concentraciones de tacrina 10 μ M el aumento sobre el control es de aproximadamente el 260%. Los autores sugieren que la tacrina ejerce su efecto estimulador en la liberación de monoaminas por interferencia con los mecanismos de recaptación de estos neurotransmisores por las vesículas presinápticas. La adición del inhibidor de la MAO, pargilina al medio de superfusión no afecta a la estimulación de la liberación inducida por tacrina. Así pues, la tacrina es capaz de liberar las aminas no metabolizadas. El efecto de la tacrina en la liberación de monoaminas puede tener lugar a través de una amplia variedad de mecanismos, incluyendo bloqueo de la recaptación,

deplección del almacenamiento de monoaminas o a través de mecanismos colinérgicos. Los heterorreceptores presinápticos muscarínicos y nicotínicos pueden regular la liberación de dopamina en miniprismas estriatales. La tacrina podría además modular la liberación de monoaminas vía receptores colinérgicos, ya sea por una acción directa en los receptores o indirectamente por inhibición de la acetilcolinesterasa. Robinson y cols (1989) aportaron evidencias de que la tacrina no libera monoaminas por un mecanismo similar al de la reserpina ni al de las anfetaminas pese a que es igual de potente que éstas últimas.

Los efectos de la tacrina en la recaptación y liberación de monoaminas en el sistema nervioso central pueden ser relevantes en su papel en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Como la tacrina no parece inhibir los receptores de monoaminas (Drukarch y cols, 1988) el aumento de la liberación conduciría a una activación de estos receptores.

La inhibición por tacrina de las formas de alta y baja afinidad de la fosfodiesterasa del AMP cíclico tendería a potenciar el resultado de la activación del receptor monoaminérgico. Curley y cols (1984) demostraron que la fisostigmina y la tacrina producían inhibiciones significativas del enzima. La tacrina es equipotente con la teofilina que, a su vez, es diez veces menos potente que la fisostigmina. Por el contrario, otros fármacos colinérgicos son inactivos. La activación de receptores monoaminérgicos por la liberación evocada por tacrina seguida de la inhibición de la fosfodiesterasa conduciría a un aumento del calcio citosólico en muchos tejidos.

Esta liberación de monoaminas también se vería potenciada por el hecho de que la tacrina es un inhibidor moderadamente potente de las monoaminoxidasas (MAO), tanto del tipo A como del B (Adem y cols, 1989). La tacrina inhibe competitiva y reversiblemente la MAO-A con una $K_i = 12.5 \mu\text{M}$, y la MAO-B con una $K_i > 500 \mu\text{M}$.

Estos datos están en contraposición con los resultados obtenidos por Tachiki y cols (1988) quienes encontraron que la inyección intraperitoneal de $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de tacrina disminuía los niveles de noradrenalina en tálamo y corteza frontal de ratas, medidos dos horas después de su administración.

La tacrina también interacciona con receptores de aminoácidos excitatorios, se une al canal iónico del receptor NMDA (Albin y cols, 1988) y facilita la neurotoxicidad de los aminoácidos excitatorios (Zhu y cols, 1988). Davenport y cols (1988) vieron que la tacrina era un antagonista moderadamente efectivo del receptor NMDA, que otros inhibidores de la acetilcolinesterasa lo eran débilmente y que la 4-aminopiridina no tenía propiedades antagonistas. Asimismo, Albin y cols (1988) sugirieron que la tacrina puede tener acciones agonista-antagonista mixtas en el receptor de la fenciclidina.

También se ha demostrado que la tacrina puede aumentar la interacción entre proteínas en la membrana celular (Butterfield y Palmieri, 1990).

La tacrina también interacciona con un sitio de fijación no identificado del cerebro de rata con una $K_D = 420 \text{ nM}$ y una $B_{\text{Máx}} = 42.7 \text{ pmoles} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína (Mena, 1988). Este sitio no se bloquea con ligandos de varios neurotransmisores. Los datos presentados por Nielsen y cols (1989) muestran que los niveles de tacrina alcanzados en cerebro son suficientes para actuar con este sitio de fijación. La distribución del sitio no coincide con la de la acetilcolinesterasa. MacNally y cols (1989) por autorradiografía vieron que la tacrina entraba rápidamente en el cerebro y se distribuía especialmente en corteza, hipocampo, tálamo y estriado distribución que no correlaciona consistentemente con la de la acetilcolinesterasa.

Bowen y cols (1990) revisaron la posibilidad de que la tacrina pudiera modular las acciones de aminoácidos neurotransmisores en la enfermedad de Alzheimer. Concluyeron que las deficiencias *post-mortem* para el GABA, la inmunorreactividad somatostatina-like y de monoaminas en las proyecciones corticopetales de pacientes de Alzheimer, podrían no requerir corrección terapéutica hasta los estadios más avanzados de la enfermedad. Estos autores creen que es más probable que los efectos beneficiosos de la tacrina dependan de su acción sobre componentes de los sistemas colinérgicos y monoaminérgicos.

Los 17 pacientes del estudio de Summers y cols (1986) mostraron mejorías espectaculares en su realización cuando se comparaba su línea de base con tacrina, o el tratamiento con los controles. Sin embargo, cuando los pacientes se dividían en varios niveles según su gravedad,

era evidente que el grado de mejoría era mucho menos dramático en los pacientes con dificultades graves que en los menos graves. Este descubrimiento ha creado un gran interés en la eficacia de la tacrina. No hay que olvidar que el posible uso concurrente de antidepresivos tricíclicos e IMAOs puede contribuir a la mejoría cognoscitiva.

Un estudio reciente cuidadosamente evaluado, randomizado, doble ciego, con placebo y cruzado (Eagger y cols, 1991), en el cual el fármaco se administra en pacientes con Alzheimer por periodos de 13 semanas, apuntaron mejorías significativas en los exámenes del estado minimental y en la puntuación del test mental abreviado, a pesar de que no se producían mejoras en las actividades de la vida diaria. Este estudio confirma un descubrimiento general de que hay una considerable variabilidad en la respuesta a la tacrina, indicando que sólo es un subgrupo de pacientes el que responde favorablemente a este fármaco, quizás sean aquellos con un mínimo daño intrínseco cortical.

Farlow y cols en 1992 han publicado los resultados del mayor estudio multicéntrico realizado para la tacrina, hasta la actualidad. En él participaron 273 pacientes. Encontraron mejorías significativas, especialmente en el grupo que tomaba dosis mayores ($80 \text{ mg} \cdot \text{día}^{-1}$), donde el 51% de los pacientes mostraron mejorías clínicas después de 12 semanas de tratamiento.

Se ha publicado la aparición de efectos adversos desde ninguno (Kaye y cols, 1982) hasta en el 80% de los pacientes (Gauthier y cols, 1988). El patrón total de efectos adversos sugiere que dosis altas de tacrina (más de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ por vía intravenosa o 150-200 mg por vía oral y día) tienen la mayor probabilidad de producir efectos adversos. El efecto adverso más problemático asociado a la tacrina es el aumento de los enzimas sanguíneos, por ejemplo, GOT, GPT y LDH que sugieren hepatotoxicidad (Kumar, 1989; Chatellier y Lacomblez, 1990; Gauthier y cols, 1990). Otros problemas son náuseas, vómitos, diarrea, diaforesis, erupciones, molestias abdominales y erupciones cutáneas.

Existe un gran número de sugerencias para explicar porque la respuesta de la tacrina es tan variable: Las deficiencias neuroquímicas de la enfermedad de Alzheimer pueden ser heterogéneas (Becker y Giacobini, 1988). El diagnóstico se realiza cuando el paciente está

tan deteriorado que la respuesta al tratamiento puede ser marginal. Además existen dos tipos de enfermedad de Alzheimer: la heredable (familiar) y la que no lo es. Se necesitan más investigaciones para determinar si las deficiencias neuroquímicas son diferentes entre los dos tipos de enfermedad, ya que el tratamiento iría claramente dirigido hacia una lesión específica. Se necesita conocer más sobre las modificaciones progresivas porque ¿son anteriores las lesiones colinérgicas que las aminérgicas?

Las discrepancias entre los diferentes estudios se podrían explicar por los distintos métodos usados, porque el grado de progresión de la enfermedad varía y la gravedad de los síntomas puede fluctuar, y porque no siempre los estudios incluyen un grupo control correctamente randomizado. Por otra parte, mejorías espontáneas o una progresión atípicamente lenta de la enfermedad podrían confundirse con la respuesta a un fármaco activo (Small, 1992). Además, muchos estudios emplean el diseño cruzado, sin dejar un periodo de blanqueo del fármaco, por lo que los efectos de la tacrina podrían superponerse con la fase de placebo, enmascarando la detección de efectos del fármaco activo. Los estudios también difieren en el nivel de ajuste del diagnóstico, la dosis empleada, el uso concomitante de otras medicaciones, la monitorización de los niveles plasmáticos y el intervalo de dosificación para determinar la dosis de tacrina óptima para cada paciente (Small, 1992).

La tacrina se ha tratado con mayor entusiasmo que la fisostigmina como agente terapéutico (Summers y cols, 1986). A pesar de que los ensayos con muchos pacientes han evidenciado pequeños o nulos efectos de la tacrina (Chatellier y Lacomblez, 1990; Gauthier y cols, 1990; Molloy y cols, 1991).

Como ya se ha mencionado la tacrina es un inhibidor de la acetilcolinesterasa reversible en tejidos cerebrales y plasma. Sin embargo, es un inhibidor más potente de la butirilcolinesterasa (Silver, 1975). La mejoría cognoscitiva puede no deberse completamente a la inhibición de estas esterasas (Beker y Giacobini, 1988; Nyback y cols, 1988). En el cerebro humano normal, la mayoría de la actividad acetilcolinesterasa cortical se localiza en el axón y en el pericario, sin embargo en el cerebro de enfermos de Alzheimer, puede haber relativamente poca acetilcolinesterasa en las estructuras corticales supervivientes. Sin

embargo, intensas manchas de acetilcolinesterasa se han visto en las placas y ovillos neurofibrilares. Estas placas y ovillos también muestran una actividad butirilcolinesterasa significativa. La tacrina es capaz de inhibir ambas enzimas (Mesulam y cols, 1987). Nyback y cols (1988) han observado que la administración de tacrina por vía oral a pacientes de Alzheimer produce un aumento sustancial en los niveles de acetilcolina en el líquido cefalorraquídeo lo cual podría ser un reflejo de aumentos de la concentración de acetilcolina en el cerebro.

Un segundo posible mecanismo de acción de la tacrina podría ser el bloqueo de los canales de potasio (Rogawski, 1987; Stevens y Cotman, 1987) o de otros canales de iones monovalentes dependientes de voltaje (Schauf y Sathey, 1987). La disminución en la permeabilidad al potasio resultante del bloqueo de los canales de potasio lentos, causa una despolarización lenta de la célula. Esta despolarización provoca un aumento de la duración del potencial de acción, lo que puede resultar en una estimulación de la liberación del neurotransmisor (Drukarch y cols, 1987). Esta acción de la tacrina parece similar a los efectos de la 4-aminopiridina, un bloqueante de los canales de potasio que aumenta la liberación de neurotransmisor en las neuronas centrales y periféricas (Dolezal y Tucek, 1983). Sin embargo, las concentraciones séricas de tacrina requeridas para afectar los canales de potasio son mucho mayores que los niveles requeridos para un efecto terapéutico (Park y cols, 1986).

Finalmente, otro posible mecanismo de acción sería el efecto directo de la tacrina sobre los receptores nicotínicos y muscarínicos, especialmente del subtipo M_2 . Nordberg y cols (1988) publicaron que la tacrina compite con la [3H]-nicotina para unirse a su receptor y con el antagonista muscarínico [3H]-QNB así como con agonistas muscarínicos para unirse a sus sitios de fijación, principalmente a los M_2 , en corteza cerebral humana. Esta acción directa sobre los receptores podría aumentar la actividad colinérgica en la sinapsis. Sin embargo, la regulación a la baja selectiva para los receptores M_1 que se ha observado después de la administración crónica de tacrina en ratas (Flynn y cols, 1987; Flynn y Mash, 1989) puede disminuir su eficacia a largo plazo en el tratamiento con tacrina de enfermos de Alzheimer.

La terapéutica con tacrina presenta ventajas frente al uso de la fisostigmina. Por ejemplo, la acción de la tacrina es más prolongada que la de la fisostigmina. Forsyth y cols (1989) y Hartvig y cols (1990) encontraron que la biodisponibilidad por vía oral de la tacrina mostraba grandes diferencias interindividuales, y que esto sería un importante problema para su uso terapéutico. La tacrina parece tener un margen terapéutico mayor que el de la fisostigmina. Esto puede deberse en parte a su capacidad para bloquear los receptores muscarínicos, protegiéndolos de un exceso de acetilcolina después de inhibir la acetilcolinesterasa. Además, la tacrina no bloquea los receptores nicotínicos, que están disminuidos en la enfermedad de Alzheimer (Nilsson y cols, 1987). Es posible que el bloqueo parcial de los receptores muscarínicos podría protegerles de la activación, mientras que se permitiría la estimulación de los receptores nicotínicos que todavía son funcionales. La capacidad de la tacrina para bloquear los canales de potasio es probable que prolongue los potenciales de acción presinápticos y así aumente la liberación del neurotransmisor. No se conoce si la síntesis o liberación de acetilcolina es limitante en la enfermedad de Alzheimer.

La tacrina es también un inhibidor de la MAO, esto puede potenciar los efectos de un aumento de la liberación. Esta actividad puede resultar interesante dado que se ha observado que los sistemas aminérgicos juegan un papel muy importante en la enfermedad de Alzheimer (Tachiki y cols, 1988; Haroutunian y cols, 1988).

Finalmente concluiremos que la compleja farmacología de la tacrina sugiere que la terapéutica dirigida al restablecimiento de un único sistema de neurotransmisión es poco probable que sea efectiva (Freeman y Dawson, 1991),

2. OTRAS ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS

Quizas sea una supersimplificación suponer que las funciones cognitivas complejas, comprometidas en la demencia puedan ser restablecidas manipulando los niveles de neurotransmisores particulares. Los problemas específicos parecen alcanzar varios niveles al intentar reemplazar directamente la pérdida de neurotransmisores evidente en la demencia.

Esta estrategia requiere claramente suficientes neuronas intactas y sistemas de receptores capaces de responder. Como hay más de un sistema de receptores disminuido en la demencia, el reemplazo unitario de neurotransmisores podrá ser de uso limitado.

Resulta difícil de imaginar como la administración de un fármaco solo puede mimetizar adecuadamente los patrones temporales del neurotransmisor endógeno liberado. Además, la especificidad anatómica puede ser una cuestión crucial dado que la de los neurotransmisores tienen una distribución muy amplia, pero su neuropatología está muy circunscrita afectando sólo a regiones muy específicas del sistema nervioso central. Además se requeriría una dosificación para cada paciente en función de la edad, tipo de demencia y el estado específico del neurotransmisor. Otro problema potencial del uso de agonistas en terapéutica es la propia dinámica del receptor que tiende a desensibilizarse o a sufrir regulaciones a la baja después de la exposición constante a agonistas (Raff, 1976).

Recientes evidencias clínicas sugieren que ni las manipulaciones del precursor de la síntesis de acetilcolina ni la aplicación de fármacos colinomiméticos, inhibidores de la acetilcolinesterasa o agonistas muscarínicos centrales producen efectos a largo plazo para mejorar las deficiencias cognoscitivas (Biesold y Arendt, 1989). La degeneración de los componentes neuronales del núcleo basal de Meynert detectada en principio en la enfermedad de Alzheimer, no se restringe a esta enfermedad sino que también pueden observarse en otros desordenes neuropsiquiátricos con problemas de memoria y cognición (Biesold y Arendt, 1989). Es por ello que puede ser igualmente racional considerar la terapéutica catecolaminérgica en la demencia mediante el uso de inhibidores de la monoaminoxidasa, no sólo en la depresión asociada al inicio de la enfermedad sino también para facilitar la memoria.

La importante interacción colinérgica-catecolaminérgica en los procesos de memoria se observa en un estudio en el cual el inhibidor de la MAO-A, miclobemide, se mostró efectivo en eliminar la amnesia inducida por escopolamina en voluntarios sanos (Wesnes y cols, 1990). La selegilina y el L-deprenil (IMAO-B) también se han mostrado beneficiosos en los pacientes de Alzheimer, mejorando su autonomía en las actividades diarias (Monteverde y

cols, 1990), la capacidad para procesar, almacenar y recuperar una información dada (Cambi y *cols*, 1990) y la memoria y la atención (Piccinin y *cols*, 1990).

Hay considerables evidencias de que la actividad de las neuronas colinérgicas de la base del cerebro anterior, la mayor fuente de aferencias colinérgicas corticales, está controlada por neuronas inhibitoras gabérgicas, originadas predominantemente desde el núcleo accumbens (Sarter y *cols*, 1990). La pérdida parcial de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal durante la enfermedad de Alzheimer, puede además conducir a la proliferación dendrítica gabérgica con hiperinervación de las neuronas colinérgicas presentes.

Sarter y *cols* (1990) han propuesto que la inhibición gabérgica puede ser considerada como una aproximación terapéutica a la enfermedad de Alzheimer, al estimular la innervación colinérgica en la corteza cerebral. Al contrario que el bloqueo de la acetilcolinesterasa, esta estrategia elimina el problema potencial de un aumento persistente en los niveles de acetilcolina que pueden estimular los autorreceptores inhibitorios M_2 , que presentan una mayor afinidad por la acetilcolina que los receptores M_1 . Un fármaco útil podría ser una β -carbolina, ZK 93426, un agonista parcial inverso que actúa en el sitio de las benzodiacepinas y que sin afectar la fijación del GABA modula la transmisión gabérgica. Se ha visto que administrado en voluntarios sanos aumenta el procesamiento de la información y la vigilancia.

Se ha podido comprobar a nivel experimental que las infusiones del factor de crecimiento nervioso exógeno pueden rescatar las neuronas colinérgicas del cerebro anterior, después de una axotomía experimental (normalmente seguida por la subsecuente muerte celular) pueden rectificar los defectos de memoria en ratas Fischer adultas. Dado que los receptores del factor de crecimiento nervioso se mantienen en las neuronas colinérgicas supervivientes del cerebro anterior en la enfermedad de Alzheimer, a pesar de que se han perdido en lugares diana como el hipocampo en los casos avanzados o preseniles (Kerwin y *cols*, 1991), esta podría ser una nueva vía en terapéutica.

Finalmente, se ha comprobado que las disfunciones cognoscitivas y de aprendizaje características de lesiones septales del hipocampo pueden restablecerse parcialmente por injertos de trozos colinérgicos septales en hipocampo. Este restablecimiento se bloquea con atropina. Por otra parte, los parches noradrenérgicos y serotoninérgicos por sí solos no tienen efectos.

OBJETIVOS

La 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridina es una sustancia derivada de la 4-aminopiridina, que se utilizó inicialmente por sus propiedades inhibitoras de la acetilcolinesterasa en el tratamiento farmacológico de las disfunciones cognoscitivas que se producen en la enfermedad de Alzheimer. Este compuesto ha demostrado una eficacia clínica mucho mayor que otros fármacos facilitadores de la neurotransmisión colinérgica, lo que sugiere que su perfil farmacológico es complejo, pudiendo actuar diferentes niveles.

Dado que existen evidencias en la literatura de la existencia de una interacción entre los sistemas noradrenérgico y colinérgico en el sistema nervioso central, interacción que podría estar íntimamente ligada a los procesos de aprendizaje y memoria, aquellas farmacoterapias que afecten a ambos sistemas de neurotransmisión podrán ser de gran utilidad en la reversión de las deficiencias cognoscitivas asociadas al envejecimiento y otros procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer.

A la vista de estos resultados, el objetivo central de este estudio ha sido evaluar la eficacia de la tacrina para mejorar el deterioro de la memoria reciente que se produce durante el proceso fisiológico del envejecimiento y analizar la posible participación del sistema β -adrenérgico en dicha acción.

Hasta ahora, la mayoría de los estudios han investigado la formación, concentración y degradación de neurotransmisores, además de haber un importante número de estudios de fijación a receptores (Zhou y cols, 1984; Zubenko y cols, 1989). No obstante, los cambios en la densidad de receptores no determinan necesariamente una modificación de la respuesta funcional. Una aproximación de los cambios funcionales se consigue determinando la formación de segundos mensajeros.

Al igual que sucede con otros neurotransmisores, el adrenoceptor β está acoplado a la activación del sistema adenilato ciclasa, por lo que nuestro diseño experimental se ha basado en la medida de la acumulación de AMP cíclico en una región cerebral íntimamente relacionada con los procesos de consolidación de la memoria reciente, como es el hipocampo, comparándola con la corteza cerebral. Las determinaciones se han efectuado en dos cortes

transversales de edad (2 y 18 meses) con el fin de poder analizar las respuestas diferenciales asociadas al proceso de envejecimiento.

Así pues, los objetivos concretos del presente proyecto han sido:

1. Evaluar la acción de la tacrina sobre las alteraciones en la memoria reciente que se producen durante el envejecimiento y establecer las alteraciones neuroquímicas producidas como consecuencia del tratamiento. Para ello se ha estudiado:
 - 1.1. El deterioro de memoria reciente asociado al proceso fisiológico de envejecimiento en el test de evitación pasiva de un único ensayo.
 - 1.2. La influencia de la tacrina sobre la retención de un hábito aversivo previamente aprendido, en los animales de 18 meses.
 - 1.3. La influencia de un bloqueante de los adrenoceptores β sobre la acción de la tacrina en el test de evitación pasiva de un único ensayo.
 - 1.4. Las alteraciones de los niveles de AMP cíclico asociados a la edad en situación basal, tras la inhibición de la fosfodiesterasa y después de la estimulación del adrenoceptor β con isoprenalina.
 - 1.5. Las alteraciones de los niveles de AMP cíclico con una dosis de tacrina efectiva para mejorar la retención en los animales sometidos al test de evitación pasiva de un único ensayo y a los treinta minutos de la inyección.
2. La segunda fase del estudio se ha dirigido a profundizar en el mecanismo por el cual la tacrina es capaz de alterar la funcionalidad del sistema β adrenérgico central. Para ello:
 - 2.1. Se determinaron las modificaciones provocadas por el fármaco *in vitro*, sobre la formación de AMP cíclico acoplada al adrenoceptor β en corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes, con el fin de compararlas con los resultados obtenidos *in vivo*.

- 2.2. Se analizó el perfil de actividad de la tacrina sobre el adrenoceptor β , empleando una preparación clásica, como es el conducto deferente aislado de rata.
- 2.3. Se evaluó si la interacción tenía lugar directamente a nivel del complejo adenilato ciclasa a través de su subunidad catalítica, analizando la acción del fármaco sobre la acumulación de AMP cíclico estimulada por forskolina.
- 2.4. Se estudió la posible existencia de un componente colinérgico en la acción de la tacrina, evaluando, por una parte el efecto sobre este mismo sistema de transducción de una sustancia con potente actividad inhibidora de la acetilcolinesterasa, la fisostigmina, y la influencia del bloqueo de los receptores muscarínicos mediante la adición al medio de incubación de atropina.
- 2.5. Por último, se analizó si la acción de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico acoplada a la activación del adrenoceptor β , era exclusiva sobre este receptor o por el contrario era extensiva a otros adrenoceptores, más concretamente el α_1 . Para ello se determinó la actividad de este fármaco *in vitro* sobre los dos sistemas de transducción asociados a este receptor: la formación de AMP cíclico y el metabolismo de fosfoinosítidos de membrana, en corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los experimentos se realizaron en ratas albinas macho de la raza Sprague-Dawley (cepa OFA) suministradas por IFFA Credo (francia) al estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona, un mes antes de su utilización, para permitir la aclimatación de los animales. Se utilizaron ratas de 2-3 meses de un peso medio de 250 ± 50 g, como grupo de animales jóvenes. El grupo de animales adultos lo formaron ratas de 18 meses y un peso medio de 850 ± 100 g.

Hasta el momento del ensayo los animales se mantuvieron estabulados en condiciones controladas constantes de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (40-60%), con acceso libre a comida y bebida, y sometidos a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad.

2. FÁRMACOS UTILIZADOS

- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico) (Sigma Chemical Company), disuelta en agua destilada para conseguir la concentración adecuada.
- [^3H]-AMP cíclico (New England Nuclear) ($9.1 \text{ mCi} \cdot \text{mg}^{-1}$), disuelto en agua para obtener una solución madre de radiactividad final ($1 \mu\text{Ci} \cdot \text{mL}^{-1}$).
- Atropina (E. Merck Darmstadt), disuelta en agua destilada.
- Bromoacetilalprenolol mentano (BAAM) (Research Biochemicals Incorporated). Se preparó una solución madre en etanol al 10%. Posteriormente se realizaron las diluciones oportunas de manera que las soluciones utilizadas tuvieran siempre un contenido final en etanol inferior al 0.1%, dado que se ha demostrado que una concentración de alcohol inferior al 0.1% no modifica la actividad adenilato ciclasa basal (Kitamura y cols, 1985).
- Carbón activado (Sigma Chemical Company), disuelto en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, adicionado con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 10 mM, 2-mercaptoetanol 6 mM y un 2% de seroalbúmina bovina.

-
- Desipramina (DMI) (Sigma Chemical Company). La solución madre se realizó en agua destilada, mientras que el resto de las diluciones, hasta conseguir la concentración final del ensayo, se prepararon con solución Krebs-Ringer modificada con ácido ascórbico ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).
 - Fenoxibenzamina (Smith, Kline & French). Se preparó una solución madre en ácido tartárico 0.2 mM y se efectuaron las diluciones adecuadas en agua destilada.
 - Fisostigmina (Flucka Chemie). Se preparó una solución madre en etanol al 10%. A continuación se realizaron las diluciones oportunas en agua destilada para que en los ensayos las soluciones utilizadas tuvieran un contenido en etanol inferior al 0.1%.
 - Forskolina (Sigma Chemical Company). Se preparó una solución madre en etanol absoluto para posteriormente realizar las diluciones oportunas, de manera que las soluciones utilizadas tuvieran siempre un contenido en etanol inferior al 0.1%.
 - [^3H]-inositol (mio-2-(^3H))inositol (New England Nuclear). Se comercializa en solución acuosa estéril de $1 \text{ mCi} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($14\text{-}17 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$). Esta solución se purificó con 0.5 mL de resina Dowex 1-X8 (forma formiato, 100-200 mesh). El resto de diluciones se realizaron en solución Krebs-Ringer.
 - 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Sigma Chemical Company), disuelto a la concentración deseada en agua destilada.
 - Isoprenalina (Sigma Chemical Company), preparada a la concentración adecuada en solución Krebs-Ringer adicionada con ácido ascórbico ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Las soluciones se prepararon extemporáneamente, manteniéndose protegidas de la luz hasta el momento de su utilización.
 - 2-mercaptoetanol (Flucka Chemie), disuelto a una concentración 6 mM en solución tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4.
 - Noradrenalina (Sigma Chemical Company), preparada extemporáneamente a la concentración adecuada en solución Krebs-Ringer adicionada con ácido ascórbico ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Para prevenir la oxidación del fármaco las soluciones se mantuvieron al abrigo de la luz hasta el momento de su utilización.
 - Prazosina (Pfizer). Se preparó una solución madre en etanol al 10%. Posteriormente se realizaron las diluciones oportunas, de manera que las soluciones utilizadas tuvieran siempre un contenido en etanol inferior al 0.1%.

- Seroalbúmina bovina (Sigma Chemical Company), disuelta al 2 % en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4:
- 1,2,3,4-tetrahidro-9-aminoacridina (tacrina) (Janssen Pharmaceutica), disuelta a la concentración adecuada en agua destilada.
- Yohimbina (Sigma Chemical Company), disuelta en agua destilada hasta obtener la concentración adecuada.

Las otras sustancias empleadas pertenecen a la categoría de reactivos químicos, todas ellas de calidad para análisis.

MÉTODOS

A. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

1. VALORACIÓN DE LA MEMORIA RECIENTE

Como modelo animal se empleó la rata adulta. Existen varias aproximaciones para desarrollar modelos animales con alteraciones de memoria, por ejemplo aquellos que utilizan el bloqueo de la función colinérgica (Flicker y cols, 1983; Haroutunian y cols, 1985) y noradrenérgica (Zornetzer, 1986). Sin embargo, el modelo que parece ser más adecuado es aquel que emplea animales viejos, pese a que los roedores no padecen la enfermedad de Alzheimer y en general desarrollan pocos de los hechos neuropatológicos observados en dicha enfermedad (Bartus y Dean, 1987). Tanto en la enfermedad de Alzheimer como en la ratas viejas se observa una incapacidad para recordar eventos, preferentemente aquellos que son discretos y breves. En ambos casos aparecen grandes deficiencias en situaciones en las que no hay oportunidad de práctica o repetición, ni posibilidad de volver a oír la información a recordar. Además el curso temporal de pérdida de la retención es relativamente rápido (habitualmente en horas o minutos) tanto para el enfermo de Alzheimer como para la rata vieja.

Entre los diversos métodos disponibles para el análisis de los procesos de retención, la prueba seleccionada fue un test estándar de evitación pasiva de un único ensayo, que proporciona una medida fiable, reproducible y específica de los procesos de retención sin la aparición de factores como la ansiedad o la depresión en el animal, que podrían alterar su respuesta (Bartus y Dean, 1985). Los controles demuestran que las deficiencias de memoria observadas en los animales viejos, no pueden explicarse en función del umbral de shock, del nivel de actividad motora o de otros factores de confusión, sino que reflejan un deterioro de la capacidad de recordar por periodos de tiempo suficientemente largos, el evento aversivo aprendido.

En este tipo de prueba el animal debe inhibir un comportamiento que desarrollaría en condiciones normales con el fin de evitar un estímulo aversivo. El comportamiento escogido ha de tener una gran probabilidad de producirse, por lo que se seleccionan aquellos que presentan una predisposición innata. En concreto, en este caso, se consideró la tendencia espontánea a evitar espacios iluminados.

El modelo consiste en una caja cuyas paredes están construidas en plástico negro. La jaula está dividida en dos compartimientos iguales separados por una puerta de guillotina. Uno de los compartimientos está iluminado mediante una bombilla situada en la parte superior de la pared mientras que el otro no está iluminado. El suelo está formado por barras de acero inoxidable de 4 mm de diámetro a través de las cuales se puede administrar un shock eléctrico (Colbourn Instruments scrambled grid floor shocker, modelo E 13-08). Esta rejilla inferior puede pivotar y detectar la posición del animal mediante un microinterruptor, de manera que cuando la rata penetra con sus cuatro patas en el compartimiento oscuro, se administra una descarga eléctrica (0.5 mA, 3s) que constituye el estímulo aversivo que el animal debe recordar.

Una semana antes de comenzar los experimentos y hasta el momento de su finalización, los animales permanecieron estabulados en el recinto donde se realizaron las pruebas de comportamiento, en condiciones controladas constantes de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (40-60%), con acceso libre a comida y bebida, siendo sometidos a ciclos de 12 horas de luz/oscuridad.

Con el fin de evitar la inducción de estrés provocada por el manejo del animal, una semana antes de pasar las pruebas de comportamiento, las ratas recibieron diariamente sesiones de manipulación, para irse habituando al contacto con el experimentador.

Los estudios se realizaron siempre en el mismo momento del día, entre las 10-12 horas de la mañana, ya que es en este periodo cuando se registran en el hipocampo los valores más altos de flujo sanguíneo.

1.1. Fase de adquisición

El modelo experimental utilizado consta de dos etapas. En una primera fase de entrenamiento, el animal se colocó en el compartimiento iluminado y, tras un periodo de acomodación de 10 segundos, la puerta de guillotina se levantó permitiendo la entrada del animal en el segundo compartimiento, no iluminado. Una vez el animal hubo penetrado con las cuatro patas en este último, la puerta se cerró impidiendo su salida. En ese momento se administró a través de la rejilla inferior metálica durante 3 segundos, una descarga eléctrica inescapable de 0.5 mA. Con el fin de garantizar que se trataba de un estímulo aversivo, se seleccionó una intensidad de shock bajo la cual los animales jóvenes no tratados presentaron latencias de evitación elevadas, acordes con la literatura. Inmediatamente después de retirar al animal del compartimiento oscuro, se le inyectó bien solución salina ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) bien el fármaco objeto de estudio a la dosis adecuada, por vía intraperitoneal, y se devolvió a su jaula.

Se realizó una administración post-entrenamiento, puesto que se ha establecido claramente que la inyección de fármacos después de esta fase afecta a los procesos que operan después del entrenamiento, y por tanto no modifica la adquisición, los procesos específicos de recuperación de la memoria ni las funciones sensoriales o motoras durante el test (Flood y cols, 1984). Esto es muy importante porque la integridad de estas funciones es necesaria para la correcta ejecución de la prueba (Barnes, 1990).

Con el fin de descartar que los efectos del fármaco pudieran ser explicados en términos diferentes de la acción específica sobre memoria reciente, bien como un efecto aversivo de la maniobra de inyección bien como una posible alteración de la actividad motora que modificara la respuesta al test, se incluyó un grupo control de animales a los que se inyectó la misma dosis del fármaco, pero no recibieron shock.

Durante la fase de entrenamiento los animales que no pasaron hacia el compartimiento oscuro en un tiempo máximo de 100 segundos fueron desechados del estudio. Con esto nos aseguramos de que el animal no presentaba problemas de actividad motora y que podía sentir el estímulo aversivo, factores muy importantes para realizar correctamente el test (Barnes, 1990).

1.2. Fase de evaluación de la retención

Transcurridas veinticuatro horas a partir de la sesión de entrenamiento, se evaluó la capacidad de retención del hábito aversivo que presentaban los animales en condiciones de extinción (sin shock). Durante esta fase el experimentador desconocía si el animal pertenecía al grupo control o al tratado, para evitar posibles influencias que pudieran modificar el resultado del test. La prueba de retención consistió en colocar de nuevo al animal en el compartimiento iluminado y en analizar el tiempo que tardaba en entrar al compartimiento oscuro. Este parámetro, que se denomina latencia de evitación, se registró automáticamente en un módulo de contaje electrónico (Colbourn Instruments, modelo R11-45). La latencia de evitación refleja la capacidad de retención, de forma que latencias elevadas manifestarían una capacidad de retención elevada y por el contrario la disminución de la latencia reflejaría una alteración en la retención.

En esta fase experimental el tiempo máximo de permanencia en el compartimiento iluminado se estableció en 600 segundos; los animales que permanecieron en el citado compartimiento durante este periodo de tiempo se consideró que habían alcanzado la latencia máxima (600), es decir presentaron una retención máxima.

2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

2.1. Experimentos preliminares

Con el fin de determinar la intensidad adecuada del estímulo aversivo, se sometió a esta prueba a un gran número de animales jóvenes. Se escogió una intensidad tal (0.5 mA) que indujo a los animales a recordar el estímulo aversivo, sin causarles una lesión en las patas (Barnes, 1990).

Para valorar el grado de pérdida de la capacidad de retención con la edad, se realizaron experimentos en los que se compararon las latencias de evitación de ratas jóvenes (2 meses) y adultas (18 meses). En esta serie experimental se inyectó a los animales solución salina fisiológica ($1\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, por vía intraperitoneal), inmediatamente después de la fase de entrenamiento.

2.2. Análisis de la acción de la tacrina sobre los procesos de consolidación en el test de evitación pasiva de un único ensayo

Con el fin de analizar la acción de la tacrina sobre los procesos de consolidación de memoria reciente en el test de evitación pasiva de un único ensayo, se probaron varias dosis del fármaco que fueron inyectadas por vía intraperitoneal, inmediatamente después de la sesión de entrenamiento. La efectividad de las diferentes dosis de tacrina para aumentar los tiempos de latencia se valoró, en condiciones de extinción, transcurridas veinticuatro horas desde la sesión de entrenamiento.

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y VALORACIÓN ESTADÍSTICA

En los estudios de comportamiento, se analizó la latencia de evitación, es decir, el tiempo que tardó el animal en pasar al compartimiento oscuro durante la fase de retención. En esta prueba, y dado el amplio rango de valores obtenido, los datos se expresaron como mediana de los tiempos de latencia con sus correspondientes rangos intercuartílicos.

La significación estadística se determinó mediante el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis, mientras que las comparaciones independientes entre grupos se valoraron mediante el test de Mann-Whitney. El nivel de significación mínimo se estableció para una $p < 0.05$.

B. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

1. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE AMP CÍCLICO

1.1. Estudios preliminares

1.1.1. Preparación de la proteína de fijación

Para la preparación de la proteína de fijación se emplearon cápsulas suprarrenales de bóvidos, suministradas por el Matadero Municipal de Sabadell. Dichas cápsulas suprarrenales, se extrajeron de animales jóvenes recién sacrificados y se transportaron en hielo hasta el Departamento de Farmacología, donde inmediatamente se inició la manipulación de las mismas. En principio se siguió la técnica de Brown y cols (1971), modificada de acuerdo con Tovey y cols (1974) para conseguir una mayor purificación de la proteína de fijación.

El proceso de purificación fue el siguiente: En primer lugar las glándulas suprarrenales se limpiaron de grasa, se cortaron por la mitad y se extrajo la médula. La corteza se troceó, se pesó y se le añadieron 1.25 volúmenes de tampón de homogeneización (Tris-HCl 50 mM, EDTA 4 mM, pH 7.5). Se realizaron tres o cuatro homogeneizaciones de 30 segundos, dejando transcurrir un intervalo de uno a dos minutos entre cada una de ellas, para evitar que la temperatura de la muestra subiera por encima de los 4°C. Para esta operación se utilizó un homogeneizador mecánico (Osterizer). Se midió el volumen final del homogeneizado y se centrifugó a 15000xg, durante 30 minutos a 4°C, en una centrífuga refrigerada (RC-5 Sorvall). El sobrenadante se fraccionó con sulfato amónico hasta un 55% de saturación, removiendo constantemente durante 30 minutos en hielo. La mezcla se volvió a centrifugar

en las mismas condiciones. A continuación se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en el 5 % del volumen inicial del homogeneizado con tampón fosfato sódico 5 mM pH 7.5, adicionado con 2-mercaptoetanol 6 mM. La proteína así obtenida se congeló a -20°C para su posterior utilización. En estas condiciones de almacenamiento, la proteína puede permanecer durante meses sin que su capacidad de fijación se vea afectada.

1.1.2. Ensayo de la proteína de fijación

Una vez purificada la proteína obtenida a partir de las cápsulas suprarrenales de bóvidos, se realizó un ensayo de fijación, según la técnica de Brown y cols (1971). Para ello se emplearon diferentes diluciones de la proteína con el fin de determinar aquella que proporcionaba una fijación de aproximadamente el 30 % del $[^3\text{H}]$ -AMP cíclico. Este experimento además permite constatar la linealidad de la unión a la proteína en los márgenes de concentración utilizados durante la realización del ensayo.

Se efectuaron una serie de diluciones de la proteína purificada (5, 10, 20, 30 y 40 veces), realizando el ensayo por triplicado según el siguiente protocolo: A cada uno de los tubos se añadieron 100 μL de tampón de Brown (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, que llevaba adicionado 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 10 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM), 100 μL de agua destilada, 50 μL de $[^3\text{H}]$ -AMP cíclico (0.1 μCi finales) y 100 μL de cada una de las diferentes diluciones de la proteína purificada. Se incubaron los tubos durante 90 minutos a 4°C . A continuación se añadieron 100 μL de una suspensión de carbón activado realizada en tampón de Brown adicionado con un 2 % de BSA. Esta suspensión se mantuvo en continua agitación durante los 15 minutos anteriores al final de la incubación, para asegurar la completa homogeneidad de la mezcla. Con el fin de sedimentar el carbón activado, los tubos se centrifugaron a 1200xg durante 15 minutos (4°C). Del sobrenadante se extrajeron 200 μL , que se pusieron en viales de conteo a los que se añadieron 4 mL de líquido de centelleo (Supersolve-X, Koch-Light LTD). Se contó cada vial 5 minutos en un contador de centelleo (LKB 1209 Rackbeta) con una eficiencia de conteo del 50-60 %. Con los resultados se realizó una recta de fijación para determinar la dilución de proteína que proporcionaba un 30 % de fijación del $[^3\text{H}]$ -AMP cíclico, que fue la empleada en el resto de los ensayos.

En la figura 1 se representa una recta típica obtenida tras la realización de un ensayo de fijación con diferentes diluciones de la proteína purificada a partir de cortezas suprarrenales de bóvido.

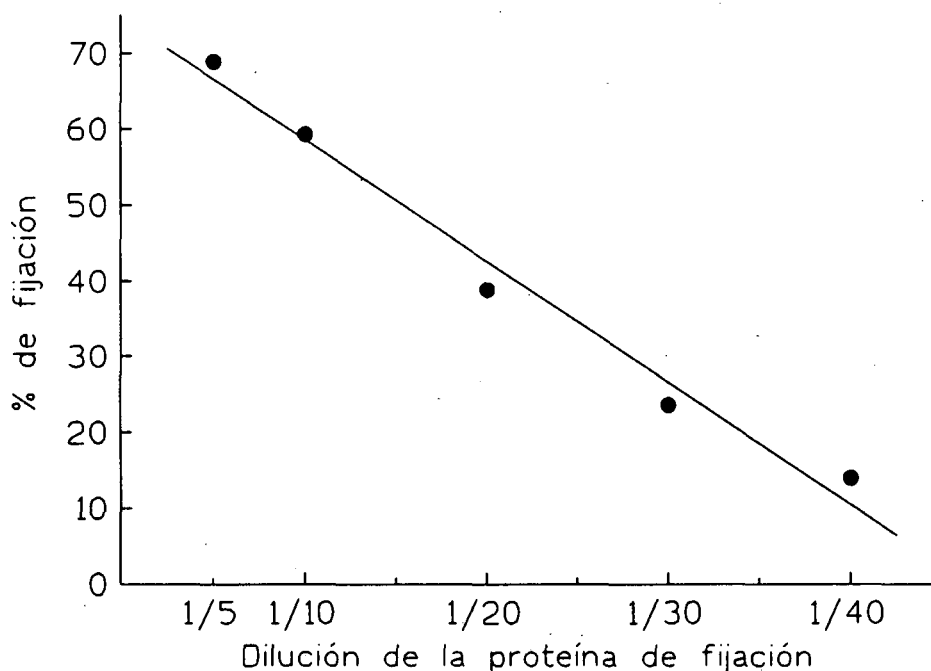


Figura 1. Recta de fijación del [^3H]-AMP cíclico a la proteína de fijación purificada a partir de cápsulas suprarrenales de bóvido. Los resultados proceden de un experimento tipo. En abscisas se representan las diferentes diluciones de la proteína realizadas frente al porcentaje de fijación del [^3H]-AMP cíclico a dicha proteína.

1.1.3. Curva estándar de AMP cíclico

Se realizó una curva estándar de fijación de AMP cíclico por desplazamiento isotópico. Para ello se prepararon concentraciones conocidas de AMP cíclico frío, que proporcionaron 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 16 pmoles de AMP cíclico en el tubo de reacción. Cada punto de la curva estándar se realizó por triplicado siguiendo el protocolo detallado en la tabla 1.

Después de añadir 100 μL de la suspensión de proteína de fijación a los tubos que lo requirieran, se dejaron incubar durante 90 minutos a 4°C. Al final de este periodo se añadieron 100 μL de una suspensión de carbón activado, excepto al último triplicado al que

se añadió el mismo volumen de agua destilada. Estos tubos, que no llevan carbón activado se utilizaron para determinar la radiactividad total empleada durante el ensayo. Finalmente, los tubos se agitaron y se centrifugaron a 1200xg durante 15 minutos (4°C). Con cuidado de no remover el sedimento, se extrajeron 200 μ L del sobrenadante que se pusieron en viales de conteo, a los que se añadieron 4 mL de líquido de centelleo. Se realizó la lectura de cada vial durante 5 minutos en el contador de centelleo.

Con estos resultados y teniendo en cuenta las cantidades de AMP cíclico no marcado añadidas a cada uno de los triplicados, se realizó una recta patrón, a partir de la cual y por interpolación se obtuvieron los valores de AMP cíclico de los diferentes experimentos. Esta curva estándar de fijación de AMP cíclico por desplazamiento isotópico, se repitió con una periodicidad mensual, con la finalidad de comprobar si la fijación del [3 H]-AMP cíclico a la proteína seguía siendo lineal en las condiciones experimentales empleadas (Fig 2).

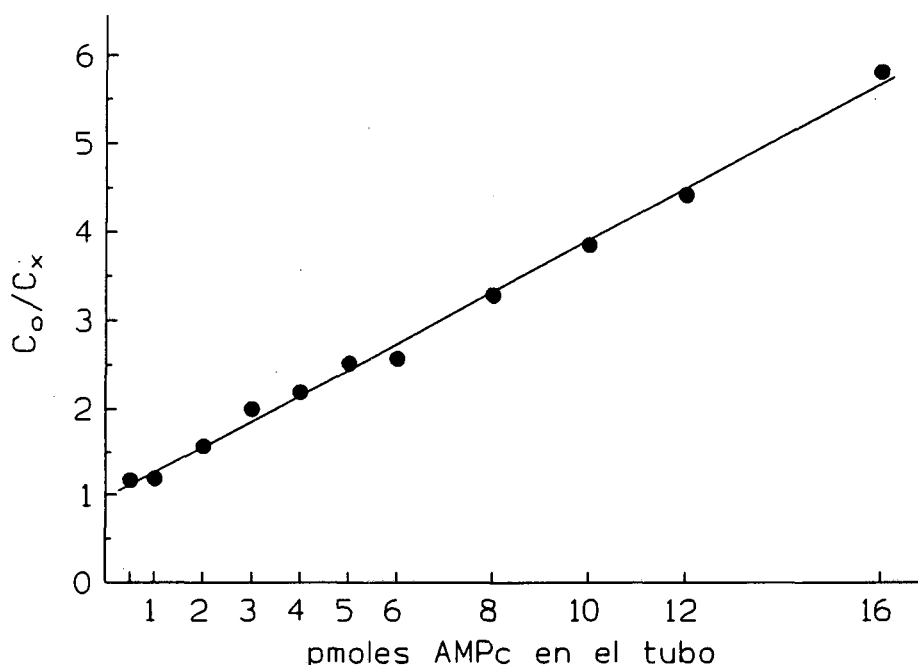


Figura 2. Curva estándar de AMP cíclico por desplazamiento isotópico de la proteína de fijación. Se representan en abscisas los pmoles de AMP cíclico presentes en el tubo de reacción y en ordenadas el cociente entre la radiactividad en ausencia de AMP cíclico frío (C_0 = fijación total) y la radiactividad remanente en presencia de cantidades crecientes de AMP cíclico frío (C_x). Como puede observarse, el ensayo es lineal en todo el rango de concentraciones utilizado.

Tabla 1. Protocolo de realización de la curva estándar de AMP cíclico por desplazamiento isotópico.

Tubo	Tampón (μ L)	Agua destilada (μ L)	[3 H]-AMPc (μ L)	AMPc frío (μ L)	Proteína (μ L)
1,2,3 (F_T)	100	100	50	-	100
4,5,6	100	50	50	50 (0.5 pmoles)	100
7,8,9	100	50	50	50 (1 pmol)	100
10,11,12	100	50	50	50 (2 pmoles)	100
13,14,15	100	50	50	50 (3 pmoles)	100
16,17,18	100	50	50	50 (4 pmoles)	100
19,20,21	100	50	50	50 (6 pmoles)	100
22,23,24	100	50	50	50 (8 pmoles)	100
25,26,27	100	50	50	50 (10 pmoles)	100
28,29,30	100	50	50	50 (12 pmoles)	100
31,32,33	100	50	50	50 (16 pmoles)	100
34,35,36 (F_I)	100	200	50	-	-
37,38,39 (R_T)	100	200	50	-	-

Tampón = Tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4, IBMX 10mM, 2-mercaptoetanol 6 mM.

F_T = Fijación total del [3 H]-AMP cíclico a la proteína.

F_I = Fijación inespecífica del [3 H]-AMP cíclico.

R_T = Radiactividad total empleada en el ensayo.

1.2. Determinación de los niveles de AMP cíclico

1.2.1. Preparación y preincubación de miniprismas cerebrales

Los animales se sacrificaron siempre entre las 10-12 horas de la mañana, dado que se ha demostrado que tanto los niveles basales, como la hidrólisis del AMP cíclico por la fosfodiesterasa están sometidos a ciclos de 12 horas, mostrando su máxima actividad en las primeras horas de luz y al anochecer (Lemmer y cols, 1987).

El método utilizado para la preparación de los miniprismas cerebrales fue el descrito por Brown y cols (1971) con pequeñas modificaciones. Los animales fueron decapitados, se extrajo el cerebro y se disecaron la corteza cerebral y el hipocampo en hielo (4°C). Con los tejidos se realizaron miniprismas de 350x350 μm con ayuda de un seccionador de tejidos McIlwain. A continuación se transfirieron los miniprismas a tubos de vidrio cerrados herméticamente, que contenían solución Krebs-Ringer (ver composición en la tabla 2) previamente gaseada con una mezcla de 95% O_2 - 5% CO_2 , durante un mínimo de 15 minutos, para estabilizar el pH a 7.4. La solución se mantuvo durante todo el proceso termostatzada a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Cuando fue necesario se añadió a la solución Krebs-Ringer ácido ascórbico ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) para prevenir la oxidación de las catecolaminas (isoprenalina y noradrenalina). Los tubos se agitaron suavemente en un baño de incubación (Unitronic 320 OR, Selecta) para permitir la correcta disgregación de los tejidos. A continuación se lavaron cuatro veces las preparaciones por aspiración, con ayuda de vacío suave.

Cuando los experimentos se realizaron con el fin de determinar la acumulación de AMP cíclico acoplada al adrenoceptor β , se procedió al bloqueo irreversible de los receptores α -adrenérgicos. Para ello se procedió a la incubación de los tejidos con un agente alquilante de estos receptores, como es la fenoxibenzamina a una concentración $1 \mu\text{M}$ (Nickerson, 1949), en el mismo tampón a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, durante 10 minutos y con agitación suave.

Cuando se analizó la acumulación de AMP cíclico acoplada a la activación de los adrenoceptores α_1 , los receptores β se bloquearon de manera irreversible con

bromoacetilalprenolol mentano (BAAM) 10 μM (Pitha y cols, 1980), en las mismas condiciones de temperatura.

Las preparaciones se lavaron cuatro veces con solución Krebs-Ringer, mediante aspiración suave con ayuda de un ligero vacío, para eliminar completamente del medio de incubación estos antagonistas. Finalmente, los miniprismas se incubaron durante 20-30 minutos (según si se investigaba la acción de los fármacos *in vitro* o *in vivo*, respectivamente) en solución Krebs-Ringer. Durante la incubación los tejidos fueron gaseados de manera constante, para recuperar los niveles intracelulares de ATP (Whittingham y cols, 1984).

Tabla 2. Composición de la solución Krebs-Ringer empleada para la realización de los diferentes experimentos. El pH de la solución se mantuvo a 7.4 gaseando durante un mínimo de 15 minutos con carbógeno (95% O_2 -5% CO_2).

	mM	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
NaCl	117.70	6.89
KCl	4.69	0.35
CaCl_2	2.47	0.27
KH_2PO_4	1.16	0.16
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.18	0.29
Glucosa	9.90	1.78
NaHCO_3	24.30	2.04

1.2.2. Tratamiento de los miniprismas con fármacos

Cuando se analizó la acción de los diferentes fármacos *in vitro*, tras una primera incubación en Krebs-Ringer a $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 20 minutos, los tejidos fueron tratados durante 10 minutos más con la concentración adecuada de las diferentes sustancias objeto de estudio.

A continuación, tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo*, se tomaron alícuotas de 0.5 mL de los tejidos y se incubaron bien con Krebs-Ringer, para determinar la acumulación basal, o con el agonista, isoprenalina o noradrenalina a las concentraciones adecuadas, para estimular la formación del segundo mensajero por activación de los adrenoceptores β o α_1 , respectivamente. En el medio se añadió 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (1 mM) con el fin de inhibir la hidrólisis del AMP cíclico formado (Beavo y cols, 1970). Los tubos se gasearon, se cerraron herméticamente y se dejaron incubar durante 10 minutos con agitación. El volumen final del ensayo fue de 0.6 mL.

Finalmente, para detener la reacción se calentaron los tubos a 100°C durante 10 minutos, se dejaron enfriar y se centrifugó en frío (4°C) a 1500xg durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante y se guardó congelado a -20°C a la espera de la posterior determinación de los niveles de AMP cíclico. De esta forma las muestras pueden conservarse durante un mes sin que se produzca un deterioro significativo de los niveles de AMP cíclico.

El contenido proteico se determinó en el sedimento obtenido para cada tubo después de la centrifugación, según la técnica de Lowry y cols (1951) utilizando como proteína de referencia seroalbúmina bovina.

1.2.3. Medida de la acumulación de AMP cíclico

La concentración de AMP cíclico se determinó en 100 μ L del sobrenadante utilizando la técnica de desplazamiento isotópico descrita por Tovey y cols (1974) con pequeñas modificaciones. Como proteína de fijación se empleó la purificada a partir de cortezas de cápsula suprarrenal de bóvido, tal como se describió en el apartado 1.1.1.

El ensayo se basa en la competición que presentan el AMP cíclico tritiado y el AMP cíclico frío por unirse a una proteína de alta afinidad y especificidad. El protocolo seguido para la medida de los niveles de AMP cíclico es muy similar al mostrado en la tabla 1, siendo realizados todos los ensayos por duplicado y en hielo. Inicialmente se realizó una dilución 1:2 de las muestras, con el fin de obtener un nivel de radiactividad que se pudiera interpolar

en la recta patrón de fijación del AMP cíclico a la proteína. Una vez añadidos los reactivos adecuados, se agitaron los tubos con ayuda de un vórtex y se dejaron reposar durante 90 minutos en hielo. Durante los 15 minutos previos a la finalización de la incubación el carbón activado se mantuvo en agitación constante para asegurar la uniformidad de la suspensión. Finalmente el AMP cíclico libre, es decir, aquél que no se había unido a la proteína, se separó del ligado por adición de 100 μL de la suspensión de carbón activado, seguida de una centrifugación a 1500xg en frío (4°C) durante 15 minutos. Con cuidado de no remover el sedimento, se transfirieron alícuotas de 200 μL del sobrenadante a tubos de conteo y se añadieron 4 mL de líquido de centelleo a cada uno de los viales para determinar la radiactividad que contenían, utilizando para ello un contador de centelleo líquido.

La cantidad de complejo [^3H]-AMP cíclico-proteína de fijación formado es inversamente proporcional a la cantidad de AMP cíclico presente en la muestra. La concentración del segundo mensajero obtenida en el ensayo, se calculó como pmoles de AMP cíclico formados por mg de proteína. Este valor se obtuvo por interpolación de la radiactividad contenida en cada muestra, en la recta patrón de desplazamiento isotópico del [^3H]-AMP cíclico de la proteína de fijación purificada a partir de cápsulas suprarrenales de bóvido.

2. MEDIDA DE LA HIDRÓLISIS DE FOSFOINOSÍTIDOS DE MEMBRANA

2.1. Preparación de los tejidos

Una vez sacrificados los animales, se extrajo el cerebro y se disecaron en hielo la corteza cerebral y el hipocampo. A partir de estos tejidos se obtuvieron miniprismas de 350x350 μM con ayuda de un seccionador de tejidos McIlwain. A continuación se transfirieron los miniprismas a un erlenmeyer que contenía solución Krebs-Ringer (ver composición en tabla 2) cuyo pH fue ajustado a 7.4 con carbógeno (95% O_2 -5% CO_2). Los tejidos se incubaron seguidamente, en un baño termostatzado, a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 30 minutos con agitación fuerte, para disgregar los miniprismas y permitir la recuperación de la carga energética (Whittingham y cols, 1984). Finalmente se lavaron tres veces las preparaciones con la misma solución mediante aspiración con ayuda de un vacío suave.

2.2. Incorporación de [^3H]-inositol a los fosfoinosítidos de membrana

Con el fin de conseguir una correcta incorporación de [^3H]-inositol a los fosfoinosítidos de membrana, los miniprismas se resuspendieron en solución Krebs-Ringer que llevaba adicionado [^3H]-inositol $0.3\ \mu\text{M}$. Los tejidos se incubaron con suave agitación en un erlenmeyer cerrado herméticamente para conseguir una atmósfera de carbógeno, durante dos horas a $37\pm 0.5^\circ\text{C}$. Esta atmósfera de carbógeno se renovó aproximadamente cada 30 minutos. Al finalizar el periodo de incubación se extrajo el medio de marcaje y se lavaron los miniprismas exhaustivamente con solución Krebs-Ringer para eliminar todo el [^3H]-inositol que no había sido incorporado por los tejidos.

2.3. Estimulación de la acumulación de los fosfatos de [^3H]-inositol

Los miniprismas premarcados con [^3H]-inositol, se empaquetaron por sedimentación y aspiración del sobrenadante. Alícuotas de $50\ \mu\text{L}$ se transfirieron a tubos de ensayo que contenían $400\ \mu\text{L}$ de solución Krebs-Ringer. El tampón llevaba adicionado LiCl $10\ \text{mM}$, con el fin de inhibir la enzima inositol-1-fosfatasa (Berridge y cols, 1982) y permitir así la acumulación de los diferentes fosfatos de inositol; y ácido ascórbico $0.1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, para evitar la oxidación de la noradrenalina. Los tubos que así lo requerían contenían también $50\ \mu\text{L}$ de noradrenalina a la concentración de $0.1\ \text{mM}$. Se gasearon con carbógeno todos los tubos, se taparon herméticamente, y se incubaron durante 60 minutos a $37\pm 0.5^\circ\text{C}$, con agitación constante. La reacción se paró por la adición de $1.2\ \text{mL}$ de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v/v).

Se incluyeron una serie de tubos en los cuales el tejido se añadió sobre el medio de incubación que ya llevaba incorporada la mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v/v). Esta serie se utilizó para determinar el *tiempo cero*, que indica los fosfatos de inositol presentes en el medio y que no son debidos a la estimulación a través de receptores. La cantidad de fosfatos de inositol presentes en los tubos correspondientes al *tiempo cero*, fue sustraída a cada uno de los valores experimentales obtenidos.

A continuación se añadieron 0.5 mL de cloroformo y 0.5 mL de HCl 0.25 N para extraer los fosfatos de inositol formados, que son solubles en la fase acuosa. Finalmente, se agitaron los tubos vigorosamente y se centrifugaron a 1500xg durante 10 minutos, con el fin de obtener una buena separación de las fases.

2.4. Tratamiento de los miniprismas con tacrina

Cuando fue necesario, se realizó una incubación previa de los miniprismas con el fármaco objeto de estudio. Para ello, una vez finalizada la fase de incorporación del [^3H]-inositol, se transfirieron los miniprismas a un tubo que contenía solución Krebs-Ringer adicionada con LiCl (10 mM), ácido ascórbico ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) y tacrina $1 \mu\text{M}$. Después de la incubación, que para estos experimentos fue de 10 minutos, se empaquetaron los miniprismas para proceder a la estimulación de la formación de los fosfatos de inositol según lo descrito en el apartado 2.3. a excepción de que en este caso la solución Krebs-Ringer también llevaba incorporada tacrina $1 \mu\text{M}$.

2.5. Separación de los fosfatos de [^3H]-inositol

Los fosfatos de [^3H]-inositol formados se separaron mediante cromatografía de intercambio aniónico. Para ello se extrajeron alícuotas de 1 mL de la fase acuosa, que se neutralizaron con NH_4OH 1.5 M. Se añadieron 4 mL de agua destilada a cada tubo, y se decantaron las muestras sobre columnas de plástico rellenas con 0.5 mL de resina Dowex 1-X8 (forma formiato, 100-200 mesh). El [^3H]-inositol se eliminó de las columnas pasando a través de ellas, de manera consecutiva, 20 mL de agua y 10 mL de una mezcla de formiato amónico 60 mM y tetraborato sódico 5 mM. Los fosfatos de [^3H]-inositol se eluyeron con 15 mL de formiato amónico 1 M disuelto en ácido fórmico 0.1 M, según el protocolo descrito por Berridge y cols, 1982.

De las fracciones eluidas se tomaron alícuotas de 3 mL a las que se añadió 15 mL de líquido de centelleo, para finalmente proceder a su conteo durante cinco minutos en un contador centelleo.

Tras la elución de los fosfatos de [^3H]-inositol, las columnas se lavaron con 2 mL de ácido fórmico 1 M y 10 mL de tampón Tris-fórmico (10 mM pH 7.4), conservándose después a 4°C en ácido fórmico 0.1 M. Antes de reutilizarlas, las columnas se equilibraron con 30 mL de tampón Tris-fórmico (10 mM pH 7.4). Este ciclo de lavado y regeneración de columnas descrito por Minneman y Johnson (1984), permite la reutilización de las mismas al menos durante cuatro veces, sin merma de su eficacia.

La cantidad de [^3H]-inositol incorporada a los fosfoinosítidos se determinó extrayendo alícuotas de 100 μL de las fases orgánicas. Después de dejarlas evaporar durante una noche, se añadieron 4 mL de líquido de centelleo y se procedió a la lectura de la radiactividad en un contador de centelleo líquido durante cinco minutos.

Los resultados se expresaron como porcentaje de la radiactividad contenida en la fase acuosa con respecto a la radiactividad total, es decir, la suma de la radiactividad de ambas fases, ya que ésta es proporcional a la cantidad de [^3H]-inositol incorporado y al tamaño de la muestra. Los valores después de la estimulación con agonistas se expresaron como porcentaje sobre el valor basal, que se tomó como 100%.

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y VALORACIÓN ESTADÍSTICA

Los valores obtenidos en los experimentos bioquímicos procedieron de un mínimo de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. Los datos se expresaron como media $\pm$ error estándar de la media (E.E.M.).

Los resultados procedentes de las curvas concentración-respuesta fueron analizados por regresión no lineal, usando el paquete de software Graph Pad (ISS). Este programa proporciona una estimación de la respuesta máxima, la concentración eficaz 50 (CE_{50}) y la pendiente de la curva. Los experimentos en los cuales se utilizó una única concentración de agonista en presencia de concentraciones variables de antagonista fueron analizados como curvas de desplazamiento por análisis de regresión no lineal, con el mismo paquete informático que nos proporcionó, el valor de la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}).

La significación estadística de los efectos observados sobre la acumulación de segundos mensajeros se determinó por medio del test *t* de Student. La valoración estadística de las curvas concentración-respuesta se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). El nivel de significación mínimo se situó en $p < 0.05$.

Para la determinación de la significación estadística de las diferencias entre los valores obtenidos para la CE_{50} , se transformó dicho parámetro en su logaritmo ($pCE_{50} = -\log CE_{50}$), dado que ha sido demostrado (Fleming y cols, 1972) que parámetros de este tipo obtenidos experimentalmente siguen una distribución normal sólo después de realizar su transformación logarítmica.

C. ESTUDIOS EN ÓRGANO AISLADO

Los receptores β -adrenérgicos del conducto deferente de rata pueden estudiarse funcionalmente monitorizando la inhibición producida por los agonistas del receptor, sobre las contracciones inducidas por estimulación eléctrica. En nuestro caso se utilizó esta preparación para valorar, en un modelo aislado, la posible acción directa de la tacrina sobre el adrenoceptor β .

1. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS

Para la extracción y montaje del conducto deferente se siguió la técnica descrita por Laporte y cols (1966). Una vez sacrificado y desangrado el animal, se realizó una incisión en la zona ventral inferior para dejar al descubierto el sistema urogenital. Localizados los testículos, se evertieron hacia el exterior visualizándose los conductos deferentes de ambos lados. Posteriormente, se disecó el conducto deferente desde el epidídimo hasta su desembocadura en la vesícula seminal y próstata, cortándose por ambos extremos. Una vez disecado y cortado el conducto deferente, se trasladó a una cápsula de Petri que contenía solución Krebs-Ringer. El órgano se sujetó por un extremo con las pinzas y se fue limpiando con ayuda de unas tijeras, del tejido conectivo adyacente procurando no dañarlo ni estirarlo. Cada conducto

deferente se dividió en dos porciones realizando un corte transversal, de forma que la porción prostática representó un 40% de la longitud total del conducto deferente. Se utilizó la porción prostática porque el componente "no-adrenérgico" de la respuesta contráctil inducida por estimulación de campo, debido a la liberación de ATP (Sneddon y cols, 1984), predomina en esta porción del tejido (McGrath, 1978).

Una vez limpia la porción prostática, se hicieron dos ligaduras en sus extremos y se colocó en un baño de órgano aislado, de 30 ml de capacidad, que contenía solución Krebs-Ringer a $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$, adicionada con prazosina $1 \mu\text{M}$ y yohimbina $10 \mu\text{M}$. Estos antagonistas se añadieron al tampón para minimizar las acciones de la isoprenalina sobre los adrenorreceptores α_1 y α_2 , respectivamente. Durante todo el experimento la solución nutritiva fue gaseada de forma continua con carbógeno (95% O_2 -5% CO_2) para mantener su pH estable a 7.4. El tejido se ató por un extremo a un electrodo de platino, de manera que el órgano quedó situado entre sus dos anillas. Por el otro extremo se unió a un transductor isométrico (UF-1) conectado a un registrador electrónico (Omniscribe). El tejido se ajustó a una tensión de reposo de 0.5 g, permitiendo que se equilibrase durante 45 minutos.

2. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA

2.1. Curvas acumulativas realizadas con isoprenalina

Pasado el periodo de estabilización se procedió a la estimulación del órgano mediante un estimulador eléctrico (Harvard) ajustado para proporcionar una corriente de campo continua de una frecuencia de 0.1 Hz, voltaje supramaximal (30-40 Voltios) y una duración de 1 ms.

Cuando la respuesta contráctil inducida por la estimulación de campo, se mantuvo constante y estable, se añadió una concentración del agonista, isoprenalina ($1 \mu\text{M}$), al baño de órganos. Una vez desarrollado el efecto máximo, se lavó exhaustivamente la preparación, dejándola reposar un mínimo de 15 minutos. A continuación se volvió a exponer el órgano a isoprenalina $1 \mu\text{M}$, repitiendo el ciclo de lavado. Seguidamente se añadió de forma acumulativa y a concentraciones crecientes isoprenalina (10 nM - $10 \mu\text{M}$), hasta que dos

concentraciones progresivas del fármaco no produjeron un efecto mayor (Van Rossum, 1963), para obtener la curva concentración-respuesta completa.

2.2. Tratamiento del órgano con tacrina

Cuando se estudió el efecto de la tacrina, una vez obtenida la curva completa del agonista, se lavó la preparación varias veces y se dejó recuperar el tejido hasta que las contracciones alcanzaron la amplitud inicial. En este momento, se añadió al baño la concentración adecuada de tacrina (1-10 μM) y se dejó incubar durante 10 minutos. Finalmente, y sin eliminar la tacrina del medio, se volvió a repetir la curva concentración-respuesta acumulativa para la isoprenalina.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y VALORACIÓN ESTADÍSTICA

Las curvas concentración-respuesta se realizaron considerando la amplitud de la respuesta inmediatamente antes de la dosis inicial del agonista β -adrenérgico como 0% de inhibición, y la línea de base obtenida antes de realizar la estimulación eléctrica, como la máxima inhibición (100%).

Para la determinación estadística de las diferencias entre los valores obtenidos para las CE_{50} , éstas se transformaron en su logaritmo (Fleming y cols, 1972). La valoración estadística de las curvas concentración-respuesta se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) mientras que las comparaciones individuales se evaluaron mediante el test t de Student. La significación mínima se situó en $p < 0.05$.

RESULTADOS

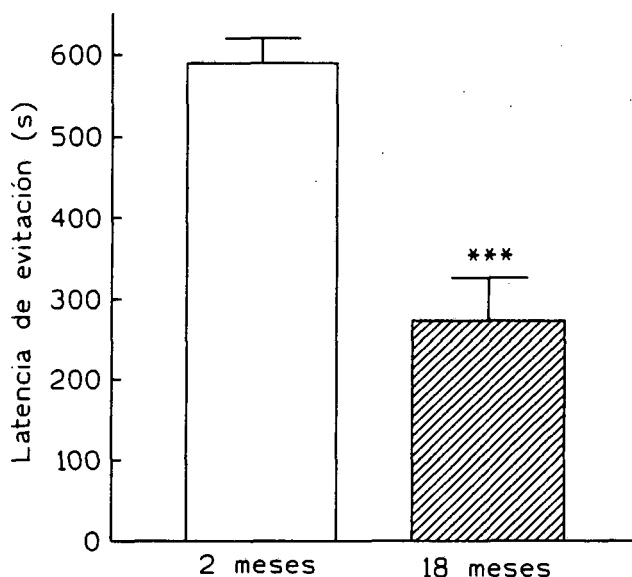
A. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD *IN VIVO* DE LA TACRINA

1. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

1.1. Controles con solución salina

En nuestro diseño experimental la evaluación de la latencia de evitación reveló diferencias importantes entre el grupo de animales jóvenes y adultos a los que se administró solución salina (1 mL·kg⁻¹ por vía intraperitoneal) inmediatamente después de la fase de entrenamiento (fig 3). En ratas jóvenes, la latencia fue muy elevada [mediana del tiempo de latencia= 589.5 (Q₂₅=539.0-Q₇₅=600)], indicando una buena retención del hábito aversivo adquirido en la fase de entrenamiento. Este parámetro se modificó con la edad, tal como lo demuestra la latencia de los animales adultos [mediana del tiempo de latencia= 273.2 (Q₂₅=212.5-Q₇₅=319.0)] que resultó ser significativamente menor que en los animales jóvenes ($p < 0.001$), presentando un porcentaje de disminución del 56.3%.

Figura 3. Latencia de evitación (valor de la mediana con su correspondiente rango intercuartílico) de ratas jóvenes (2 meses) (barras blancas) y adultas (18 meses) (barras diagonales) en el test de evitación pasiva de un único ensayo. *** $p < 0.001$ con respecto a las ratas de 2 meses.



1.2. Efectos de la tacrina

La administración de diferentes dosis de tacrina (0.1, 1, 2.5 mg·kg⁻¹) por vía intraperitoneal inmediatamente después del entrenamiento, dió lugar a una clara mejoría de la retención en el test de evitación pasiva de un único ensayo en los animales adultos (18 meses), con aumentos de la mediana de los tiempos de latencia paralelos a la dosis administrada.

La inyección de 0.1 mg·kg⁻¹ de tacrina por vía intraperitoneal, produjo un ligero incremento en la latencia de evitación [mediana del tiempo de latencia = 380 (Q₂₅ = 270-Q₇₅ = 580)], que no resultó significativo frente a la situación control (fig 4).

Cuando aumentamos la dosis hasta 1 mg·kg⁻¹ se obtuvo un incremento importante y significativo ($p < 0.05$) en este parámetro [mediana del tiempo de latencia = 553 (Q₂₅ = 369.25-Q₇₅ = 590) (fig 4).

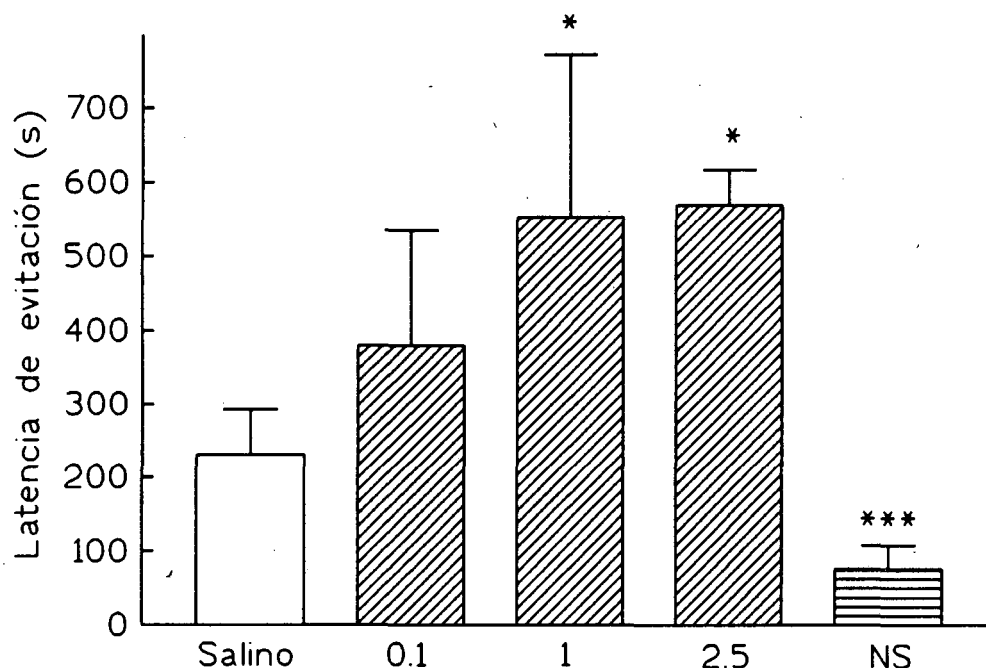


Figura 4. Efectos de la administración de 0.1, 1 y 2.5 mg·kg⁻¹ de tacrina (THA) (barras diagonales) inmediatamente después del entrenamiento sobre la retención de las ratas adultas en el test de evitación pasiva. Las barras representan latencia de evitación (mediana con su rango intercuartílico). NS = Animales que han recibido 2.5 mg·kg⁻¹ de tacrina, pero no shock. * $p < 0.05$ frente a salino, *** $p < 0.001$ frente a shock.

Por último, la inyección de tacrina a la dosis de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p. inmediatamente después de la fase de entrenamiento, mejoró significativamente el proceso de consolidación en las ratas adultas ($p < 0.05$) [mediana del tiempo de latencia = 569 ($Q_{25} = 503$ - $Q_{75} = 600$)]. Así, en este grupo de edad la latencia de evitación después de la inyección de esta dosis ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) de tacrina fue significativamente mayor que la que presentaron los animales control que recibieron solución salina ($p < 0.05$) (fig 4), presentando un rango intercuartílico menor que el obtenido con la dosis de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Este efecto obtenido parece específicamente relacionado con los procesos de retención, ya que al comparar dicho parámetro con la latencia obtenida en las ratas a las que se administró la misma dosis de tacrina pero no recibieron shock también se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) (fig 4).

La acción de la tacrina se evaluó asimismo en animales jóvenes. Sin embargo, en este caso la tacrina no aumentó significativamente la latencia de evitación con respecto a los controles que recibieron salino, debido a que los animales jóvenes control ya había alcanzado la puntuación máxima en el test.

1.3. Influencia de un bloqueante β -adrenérgico sobre la acción de la tacrina

La inyección de propranolol ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) simultánea a la de tacrina ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), inmediatamente después de la fase de entrenamiento en la prueba de evitación pasiva de un único ensayo, produjo un claro incremento en el efecto de la tacrina [mediana del tiempo de latencia = 600 ($Q_{25} = 600$ - $Q_{75} = 600$)], que no fue estadísticamente diferente del valor alcanzado cuando se administró tacrina únicamente [mediana del tiempo de latencia = 553 ($Q_{25} = 369.2$ - $Q_{75} = 590$)], si bien cabe indicar que el rango intercuartílico resultó sensiblemente disminuido cuando se combinaron ambos fármacos.

En esta serie experimental se incluyeron animales a los que se administraron las mismas dosis de los diferentes fármacos, pero no recibieron shock (0.5 mA, 3s) durante el entrenamiento, para descartar posibles efectos aversivos de la maniobra de inyección o alteraciones de la actividad motora, que pudieran alterar los resultados de la prueba. En estos animales que no recibieron el estímulo aversivo los valores obtenidos fueron: para la inyección de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

de tacrina, mediana del tiempo de latencia = 77 ($Q_{25} = 36.75$ - $Q_{75} = 133$); para la administración de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de propranolol, mediana del tiempo de latencia = 71 ($Q_{25} = 63$ - $Q_{75} = 102.25$) y para la administración conjunta de ambos fármacos, mediana del tiempo de latencia = 93 ($Q_{25} = 77.5$ - $Q_{75} = 99.5$).

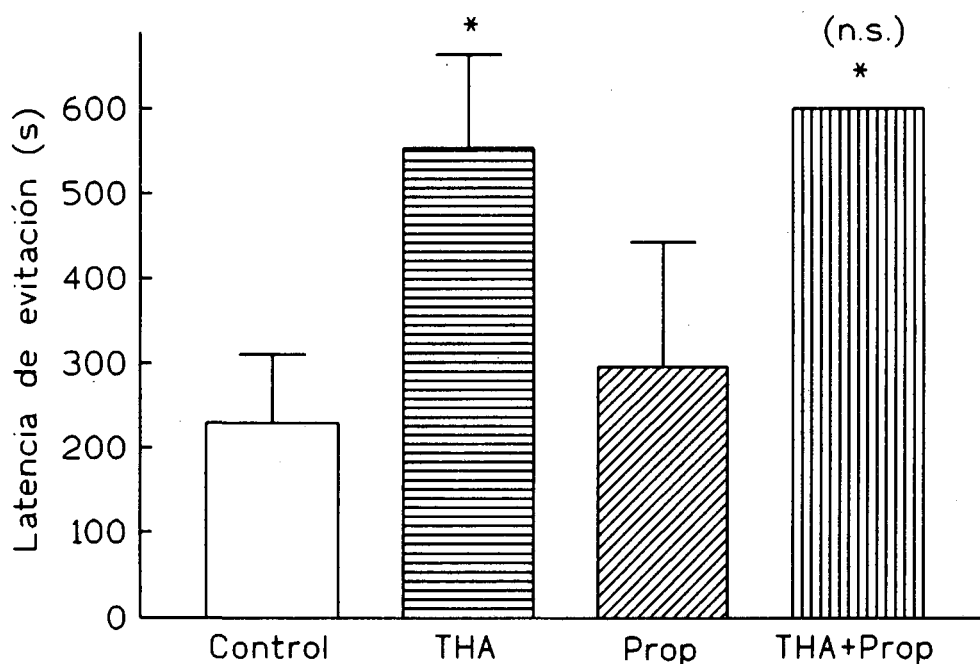


Figura 5. Efectos de la administración conjunta, inmediatamente después del entrenamiento, de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de propranolol y de $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tacrina (THA+Prop) sobre la retención de las ratas adultas en el test de evitación pasiva. Las barras representan latencia de evitación (mediana con su rango intercuartílico). THA = Animales que han recibido $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de tacrina inmediatamente después del entrenamiento. Prop = Animales que han recibido $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de propranolol inmediatamente después del entrenamiento. ** $p < 0.02$ frente al control; (n.s.) no significativo con respecto a la tacrina sola.

2. ESTUDIOS BIOQUIMICOS

Se estudiaron las variaciones producidas en los niveles de AMP cíclico acoplados a la activación del adrenoceptor β tanto en corteza cerebral como en hipocampo de animales jóvenes (2 meses) y adultos (18 meses), con el fin de detectar las posibles modificaciones asociadas al envejecimiento. A continuación se analizó el efecto de la inyección aguda de tacrina, a una dosis ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ por vía intraperitoneal) que produjo una clara mejoría en

la retención en los diferentes grupos de edad, evaluando su efecto a los 30 minutos de la inyección. Finalmente, se examinaron las modificaciones de los niveles de AMP cíclico en los distintos grupos de animales sometidos a las pruebas de evitación pasiva de un único ensayo.

2.1. Modificaciones de los niveles de AMP cíclico asociadas con la edad

Los niveles basales de AMP cíclico no presentaron modificaciones significativas asociadas a la edad ni en corteza cerebral ni en hipocampo (fig 6). Cuando se compararon las diferentes estructuras anatómicas, el hipocampo fue la región que presentó niveles basales de AMP cíclico más elevados, tanto en ratas jóvenes (83.7 pmoles de AMP cíclico·mg⁻¹ proteína en hipocampo frente a 63 pmoles de AMP cíclico·mg⁻¹ proteína en corteza cerebral, $p < 0.01$) como en adultas (70.4 pmoles de AMP cíclico·mg⁻¹ proteína en hipocampo frente a 63.6 pmoles de AMP cíclico·mg⁻¹ proteína en corteza cerebral, $p < 0.05$).

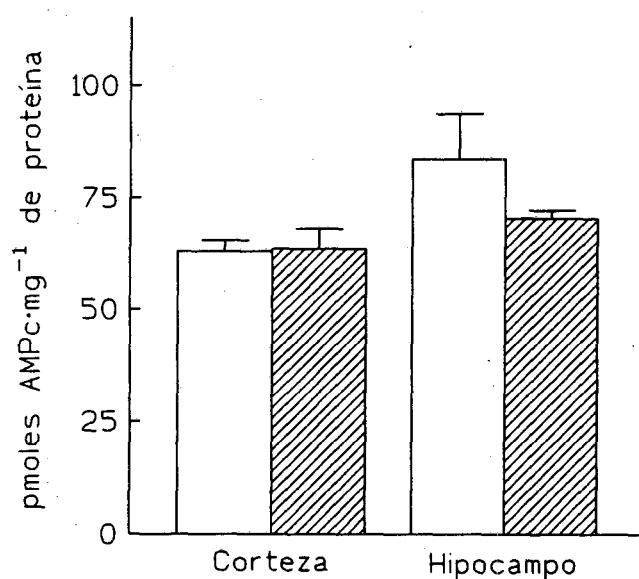


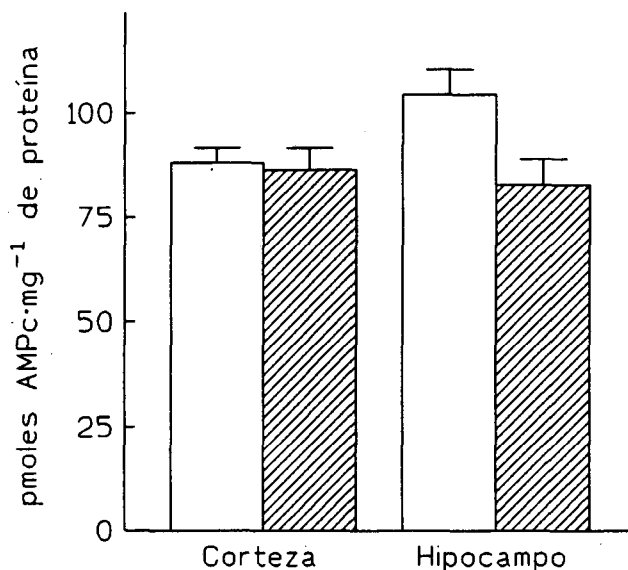
Figura 6. Niveles basales de AMP cíclico en corteza cerebral e hipocampo de animales jóvenes (barras blancas) y adultos (barras diagonales). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M.

Cuando se bloqueó la degradación del segundo mensajero mediante la incubación con el inhibidor de la fosfodiesterasa IBMX (1 mM), la acumulación de AMP cíclico resultó incrementada frente a los valores basales en corteza cerebral de los animales jóvenes (39.6%, $p < 0.001$) y adultos (35.5%, $p < 0.01$) (fig 7). Sin embargo, en el hipocampo, la acumulación de AMP cíclico sólo aumentó significativamente en las ratas jóvenes (24.7%,

$p < 0.05$) pero no en las adultas donde el aumento fue del 17.5%. De nuevo, en los animales jóvenes, los niveles alcanzados resultaron ser más altos ($p < 0.001$) en el hipocampo (104.4 pmoles de AMP cíclico·mg⁻¹ proteína) que en la corteza cerebral (87.92 pmoles de AMP cíclico·mg⁻¹ proteína) ($p < 0.01$), sin que esta diferencia apareciese en los animales adultos.

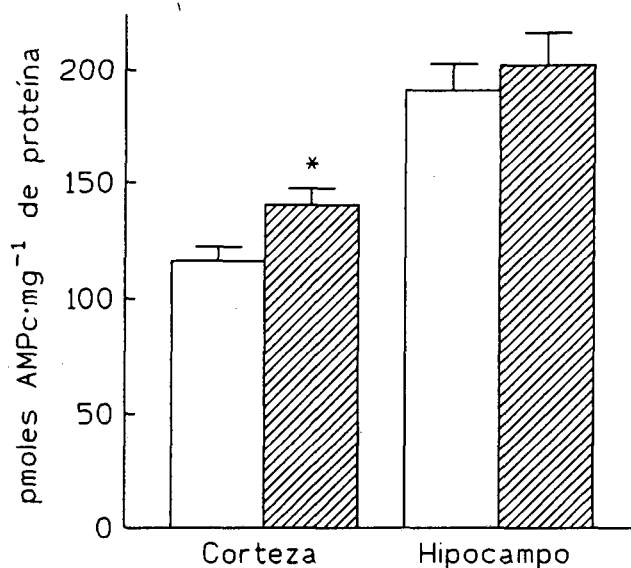
En estas condiciones experimentales, cuando se compararon los valores obtenidos en las ratas de 2 y 18 meses, no se apreciaron modificaciones significativas asociadas con la edad, ni en corteza cerebral ni en hipocampo.

Figura 7. Niveles de AMP cíclico, tras la inhibición de la fosfodiesterasa con IBMX (1 mM), en corteza cerebral e hipocampo de animales jóvenes (barras blancas) y adultos (barras diagonales). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M.



Finalmente, cuando se estimuló la actividad adenilato ciclasa a través de la activación del adrenoceptor β adicionando al medio de incubación una concentración supramaximal de isoprenalina (10 μ M), se observó un marcado incremento en los niveles de AMP cíclico en todos los grupos experimentales respecto a los niveles basales (fig 8). Este incremento fue del 84.4% y del 120.6% en corteza cerebral de animales de 2 y 18 meses respectivamente ($p < 0.001$ para ambos grupos de edad) y de 128.1% y 187.4% en hipocampo de animales jóvenes y adultos respectivamente ($p < 0.001$ tanto en animales jóvenes como en adultos). Cuando se compararon estructuras anatómicas, el hipocampo, estructura con una gran densidad de adrenoceptores β y muy relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria, resultó ser mucho más sensible a la estimulación con isoprenalina obteniéndose valores más altos que en corteza cerebral ($p < 0.001$ para ratas de 2 y 18 meses).

Figura 8. Niveles de AMP cíclico, tras la estimulación del adrenoceptor β con isoprenalina $10 \mu\text{M}$, en corteza cerebral e hipocampo de animales jóvenes (barras blancas) y adultos (barras diagonales). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.02$ con respecto a los jóvenes.



En esta situación, cuando se compararon entre sí ambos grupos de edad se pudo apreciar que a nivel cortical los valores obtenidos para la acumulación de AMP cíclico estimulada por isoprenalina eran significativamente más elevados ($p < 0.02$) en las ratas adultas que en las jóvenes. Por otra parte, en el hipocampo, pese a que se apreció un ligero incremento en los niveles de AMP cíclico, no se alcanzó la significación estadística.

2.2. Efectos de la inyección aguda de tacrina

Con el fin de determinar si la tacrina por sí misma ejercía alguna acción sobre la acumulación de AMP cíclico acoplada al adrenoceptor β , se administró a los animales una dosis de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de tacrina por vía intraperitoneal, y se sacrificaron treinta minutos más tarde, puesto que se ha descrito que durante la primera hora la concentración intracerebral de tacrina es superior a $1 \mu\text{M}$ (Nielsen y cols, 1989).

La tacrina produjo una disminución significativa de los niveles basales de AMP cíclico con respecto a los animales no tratados, tanto en corteza cerebral ($p < 0.01$) como en hipocampo ($p < 0.05$) de ratas jóvenes, mientras que en las adultas el efecto únicamente fue significativo a nivel hipocámpico ($p < 0.01$).

Cuando se compararon entre sí las dos estructuras anatómicas, el hipocampo resultó ser algo más sensible a la acción de la tacrina, siendo la disminución de los niveles basales de AMP cíclico inducida por el fármaco del 29.6% (2 meses) y del 17.2% (18 meses) en el hipocampo frente a disminuciones del 17.1% (2 meses) y del 12.4% (18 meses) en la corteza cerebral (fig 9).

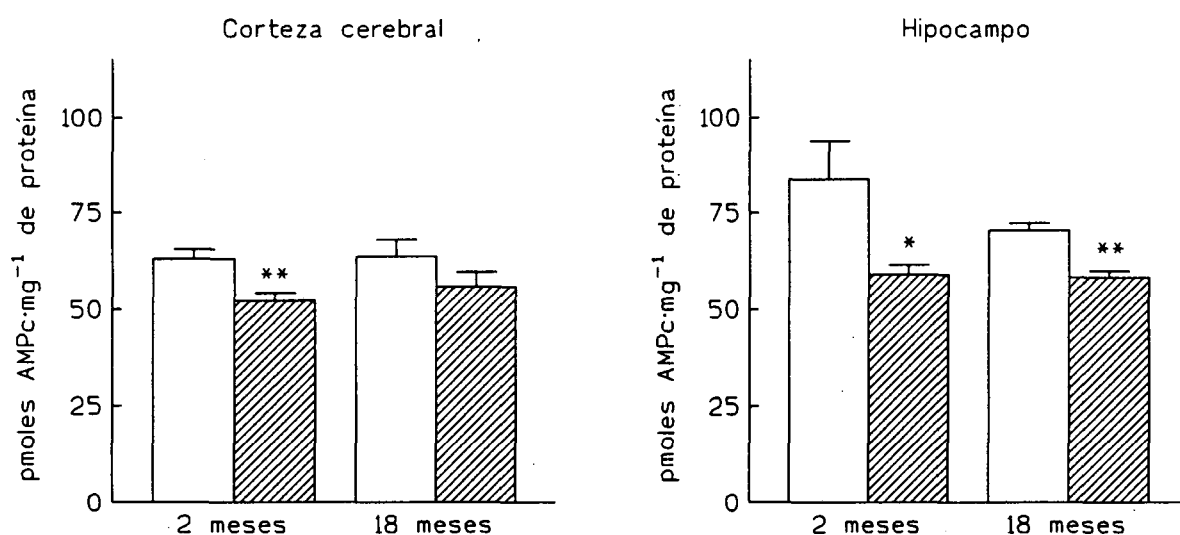


Figura 9. Acción de la tacrina (barras diagonales) ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$) sobre la acumulación basal de AMP cíclico respecto a la situación control (barras blancas), en corteza cerebral e hipocampo ratas jóvenes (2 meses) y adultas (18 meses). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ respecto a los animales control.

Cuando se inhibió la actividad fosfodiesterásica adicionando al medio de incubación IBMX (1 mM), el tratamiento agudo con tacrina indujo, en las ratas jóvenes, una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.02$) de la acumulación de AMP cíclico tanto en corteza cerebral (15.3%) como en hipocampo (28.5%) frente a los animales control. Por el contrario, el efecto alcanzado por la tacrina en los animales adultos es mucho menos importante cuando la degradación del AMP cíclico se ve impedida, no observándose diferencias significativas con respecto a las ratas no tratadas, en ninguna de las dos estructuras cerebrales estudiadas (fig 10).

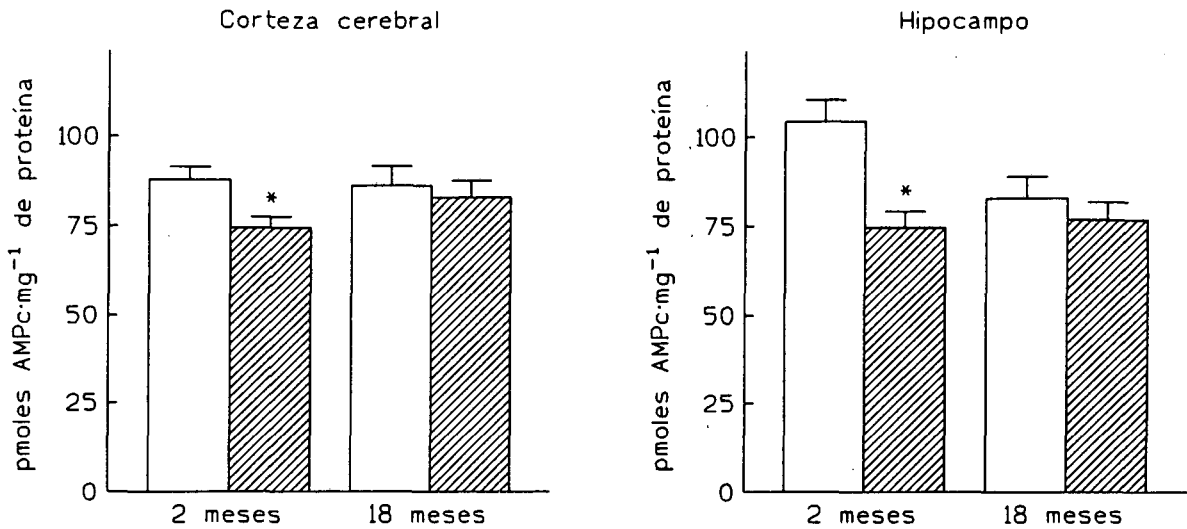


Figura 10. Acción de la tacrina (barras diagonales) ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$) sobre la acumulación de AMP cíclico tras la inhibición de la fosfodiesterasa con IBMX (1 mM) respecto a la situación control (barras blancas), en corteza cerebral e hipocampo ratas jóvenes (2 meses) y adultas (18 meses). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.02$ respecto a los animales control.

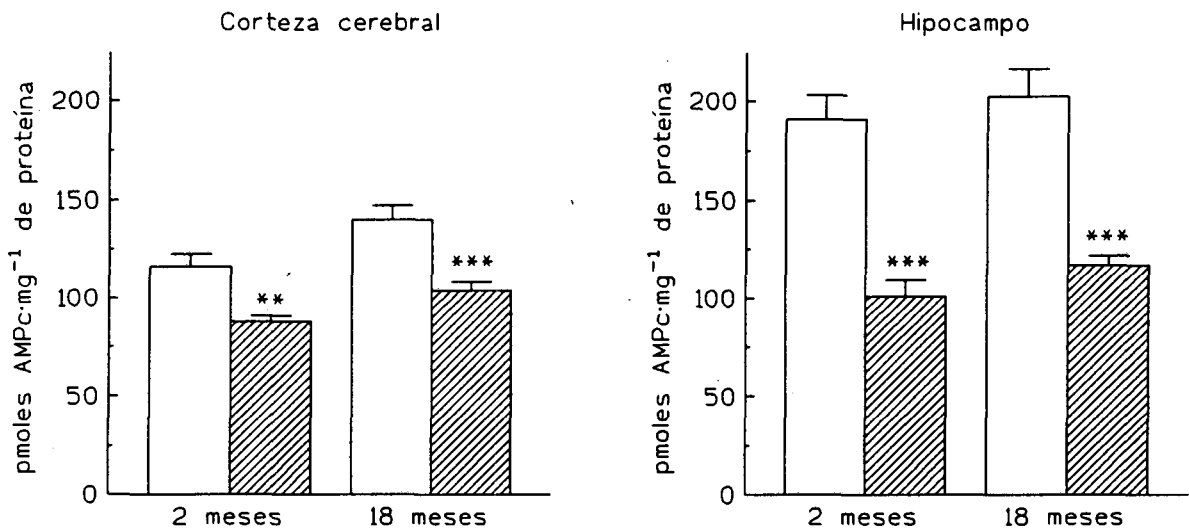


Figura 11. Acción de la tacrina (barras diagonales) ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ i.p.}$) sobre la acumulación de AMP cíclico tras la estimulación del adrenoceptor β con una concentración supramaximal de isoprenalina ($10 \mu\text{M}$) respecto a la situación control (barras blancas), en corteza cerebral e hipocampo ratas jóvenes (2 meses) y adultas (18 meses). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ respecto a los animales control.

En condiciones de estimulación de la actividad adenilato ciclasa a través de la activación del receptor β -adrenérgico, la inyección aguda de tacrina redujo sensiblemente los niveles de AMP cíclico respecto a los controles. Así, en los animales jóvenes se observaron disminuciones frente a los valores obtenidos en ratas tratadas con solución salina del 24.5% en corteza cerebral ($p < 0.01$) y del 47.1% en el hipocampo ($p < 0.001$). Esta situación se repite en los adultos donde los valores se redujeron frente a la situación control un 25.9% y un 42.2% en corteza cerebral e hipocampo respectivamente ($p < 0.001$ en ambas estructuras cerebrales) (fig 11).

2.3. Niveles de AMP cíclico en los animales sometidos al test de evitación pasiva

En esta serie de experimentos, una vez evaluada la retención del hábito aversivo aprendido durante la prueba de evitación pasiva, los animales fueron sacrificados. Inmediatamente después se determinaron los niveles de AMP cíclico, en situación control, tras la inhibición de la fosfodiesterasa y estimulando el adrenoceptor β con isoprenalina.

2.3.1. Niveles de AMP cíclico en situación control tras la administración de shock

La administración de un shock eléctrico en las patas a los animales durante el test de evitación pasiva (0.5 mA, 3 s) no indujo variaciones significativas en la acumulación basal de AMP cíclico, ni en corteza cerebral (63.7 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg $^{-1}$ proteína en jóvenes y 64.5 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg $^{-1}$ en adultas) ni en hipocampo (61.23 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg $^{-1}$ proteína en animales de 2 meses y 72.4 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg $^{-1}$ proteína en los de 18 meses) con respecto a los valores obtenidos en los animales no tratados que no habían sido sometidos a shock (fig 12).

Cuando se inhibió la actividad fosfodiesterasa adicionando al medio de incubación IBMX (1 mM), se observó que la administración de un shock eléctrico (0.5 mA, 3 s) en las patas en el test de evitación pasiva de un único ensayo, no provocaba ninguna alteración significativa de los niveles de AMP cíclico en ninguno de los dos grupos de edad, con respecto a la situación control (fig 13).

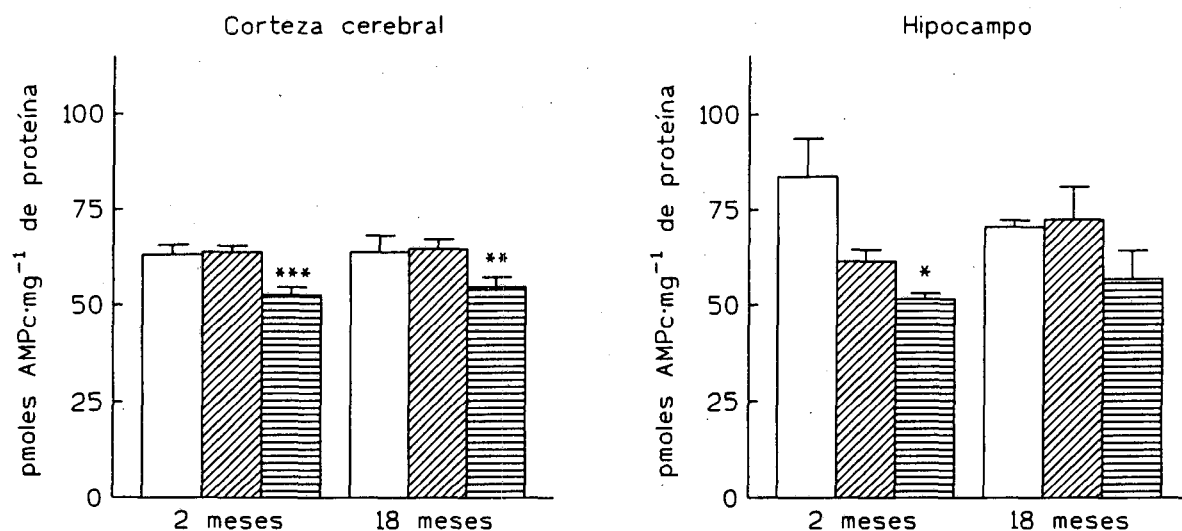


Figura 12. Niveles basales de AMP cíclico en animales tratados con salino ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) que no recibieron shock (barras blancas), en animales no tratados sometidos a shock (0.5 mA , 3 s) (barras diagonales) y en aquellos a los que se administró tacrina post-entrenamiento ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) (barras horizontales) en corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes (2 meses) y adultas (18 meses). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.001$ frente al shock.

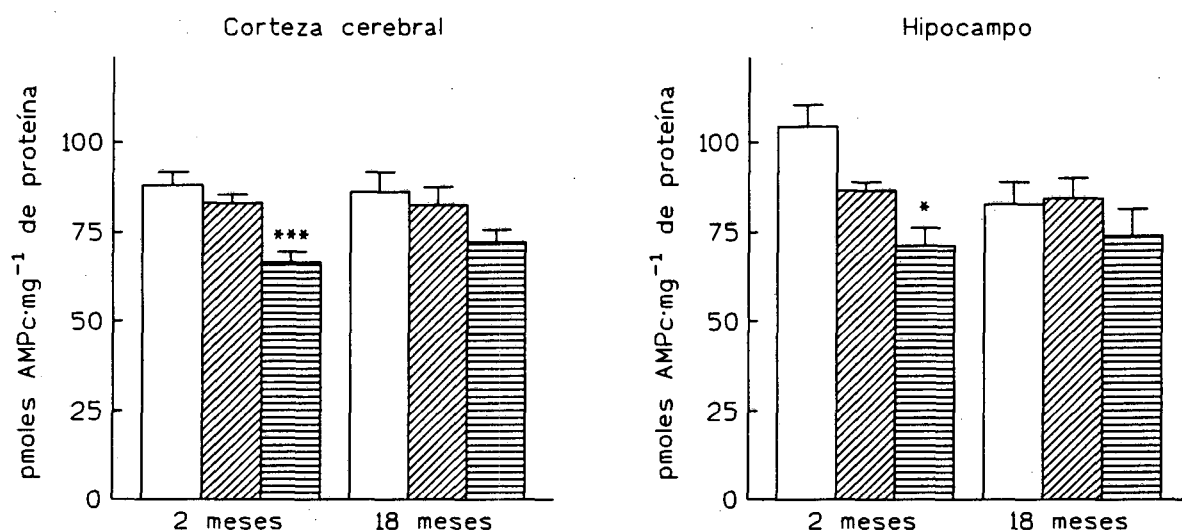


Figura 13. Niveles de AMP cíclico después de inhibir la fosfodiesterasa con IBMX (1 mM), en animales tratados con salino ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) que no recibieron shock (barras blancas), en animales no tratados sometidos a shock (0.5 mA , 3 s) (barras diagonales) y en aquellos a los que se administró tacrina ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) después del entrenamiento (barras horizontales) en corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes (2 meses) y adultas (18 meses). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ frente al shock.

Finalmente, cuando se estimuló la actividad adenilato ciclasa incubando los miniprismas procedentes de corteza cerebral e hipocampo de ratas sometidas a la prueba de evitación pasiva de un único ensayo, durante 10 minutos con una concentración supramaximal de isoprenalina ($10\ \mu\text{M}$), la aplicación de un único shock inescapable ($0.5\ \text{mA}$, $3\ \text{s}$) en las patas durante la fase de entrenamiento fue capaz de reducir la capacidad del agonista β -adrenérgico para estimular la adenilato ciclasa, apreciándose una reducción en la acumulación de AMP cíclico en todos los grupos experimentales. Este efecto alcanzó significación estadística tanto en los animales jóvenes (17.3% , $p < 0.02$ en corteza cerebral y 24.7% , $p < 0.01$ en el hipocampo) como en los adultos (19% en corteza cerebral y 31.7% en hipocampo, $p < 0.01$ para ambas estructuras) (fig 14).

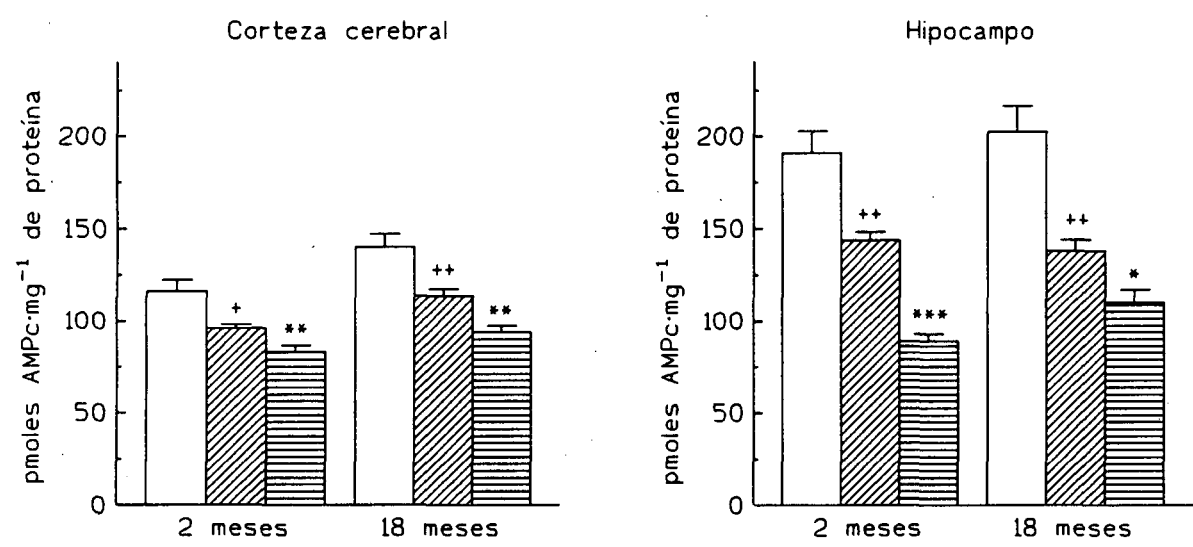


Figura 14. Acumulación de AMP cíclico después de incubar durante 10 minutos con isoprenalina ($10\ \mu\text{M}$) en animales tratados con salino ($1\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) que no recibieron shock (barras blancas), en animales no tratados sometidos a shock ($0.5\ \text{mA}$, 3s) (barras diagonales) y en aquellos a los que se administró tacrina ($2.5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) inmediatamente después del entrenamiento (barras horizontales) en corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes (2 meses) y adultas (18 meses). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, con respecto a los animales no tratados con tacrina que habían recibido shock. + $p < 0.02$, ++ $p < 0.01$ con respecto a los animales control que no recibieron shock.

2.3.2. Modificación de los niveles de AMP cíclico tras el tratamiento con tacrina

En esta serie experimental, la determinación de AMP cíclico tuvo lugar 24 horas después de la inyección del fármaco, momento en el que los niveles cerebrales de tacrina son muy bajos, teniendo en cuenta que en cerebro de rata la concentración de fármaco disminuye con una semivida biológica de 1.4 horas (Nielsen y cols, 1989). En estas condiciones se obtuvieron unos niveles basales de AMP cíclico muy similares a los observados cuando la determinación del segundo mensajero se realizó transcurridos 30 minutos de la inyección (tabla 3), a pesar de que es en este momento cuando la concentración intracerebral de tacrina es máxima (Nielsen y cols, 1989).

La inyección intraperitoneal de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de tacrina inmediatamente después de la fase de entrenamiento originó una disminución estadísticamente significativa de los niveles basales de AMP cíclico, con respecto a los animales sometidos al test de evitación pasiva de un único ensayo que habían recibido salino ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), de un 17.6% en corteza cerebral ($p < 0.001$) y del 15.7% en hipocampo ($p < 0.05$) en los animales jóvenes mientras que en los animales adultos el efecto únicamente alcanzó significación a nivel cortical (disminución del 15.3%, $p < 0.02$) (fig 12).

Para determinar si el efecto de la tacrina podía ser atribuible a un incremento en la metabolización del AMP cíclico, el estudio se repitió en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa, IBMX (1 mM). En estas condiciones experimentales, la tacrina indujo una disminución estadísticamente significativa en la acumulación de AMP cíclico (19.9%, $p < 0.001$ en corteza cerebral; 18%, $p < 0.05$ en hipocampo) de los animales jóvenes, hasta alcanzar unos niveles comparables a los que se habían obtenido en condiciones basales. Por el contrario, en los animales adultos el efecto de la tacrina no alcanzó significación estadística cuando se bloqueó la degradación del AMP cíclico, en ninguna de las dos estructuras cerebrales (fig 13).

De nuevo, el efecto producido por la inyección de tacrina a una dosis capaz de mejorar la retención de los animales adultos en el test de evitación pasiva de un único ensayo, no resultó

ser diferente del observado cuando se evaluaron las modificaciones de la acumulación de AMP cíclico transcurridos 30 minutos de la administración de la misma cantidad de fármaco (tabla 3).

Tabla 3. Niveles de AMP cíclico tras la inyección intraperitoneal de 2.5 mg·kg⁻¹ en condiciones basales (KREBS) y después de la incubación con isoprenalina 10 μM (ISO) y/o IBMX (1 mM) en corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes (2 meses) y adultas (18 meses).

	2 MESES		18 MESES	
Corteza cerebral	THA 30 min	THA 24 h	THA 30 min	THA 24 h
KREBS	52.2±1.8	52.5±2.2	55.7±3.8	54.6±2.4
IBMX	74.5±3.1	66.5±2.9	83.0±4.6	72.2±3.5
ISO	87.74±2.9	82.9±3.7	104.0±4.4	94.0±3.3
	2 MESES		18 MESES	
Hipocampo	THA 30 min	THA 24 h	THA 30 min	THA 24 h
KREBS	58.9±2.5	51.6±1.4	58.3±1.7	56.7±7.6
IBMX	74.6±4.5	71.1±5.2	76.8±4.9	74.0±7.4
ISO	100.9±8.6	88.9±4.1	117.0±5.0	110.0±7.2

Los valores se expresan como el valor medio de pmoles de AMP cíclico formado·mg⁻¹ de proteína ± E.E.M.

THA 30 min= Animales tratados con 2.5 mg·kg⁻¹ de tacrina i.p. y sacrificados 30 minutos después para determinar los niveles de AMP cíclico.

THA 24 h= Animales tratados con 2.5 mg·kg⁻¹ de tacrina i.p. y sacrificados 24 horas después para determinar los niveles de AMP cíclico.

Por último, la tacrina disminuyó la formación del segundo mensajero cuando se procedió a la estimulación de la actividad adenilato ciclasa por estimulación de los receptores β -adrenérgicos con isoprenalina ($10 \mu\text{M}$). Este efecto resultó significativo en todos los grupos experimentales, en relación al grupo de animales tratados con salino sometido a la prueba de evitación pasiva de un único ensayo. Los niveles de AMP cíclico fueron inferiores un 13.7% y un 17.3% en corteza de animales jóvenes y adultos respectivamente ($p < 0.01$ en ambos casos) mientras que en el hipocampo la disminución fue del 38.1%, $p < 0.001$ en ratas jóvenes y del 20.4%, $p < 0.02$ en adultas) (fig 14). Tampoco en esta situación se observaron diferencias entre los niveles alcanzados a los 30 minutos o a las 24 horas de la inyección intraperitoneal de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de tacrina (tabla 3).

En términos de magnitud y al igual que sucedía en los casos anteriores, el efecto de la tacrina resultó ser mucho más importante en estructuras hipocámpicas, si bien esta mayor actividad únicamente alcanzó significación estadística tras la estimulación del adrenoceptor β con una concentración supramaximal de isoprenalina ($p < 0.001$ en animales jóvenes y $p < 0.01$ en adultos).

B. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA TACRINA

1. EFECTOS DE LA TACRINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE AMP CÍCLICO ACOPLADA AL ADRENOCEPTOR β

Se han estudiado las variaciones producidas en los niveles de AMP cíclico ligados a la activación del adrenoceptor β tras la incubación de los tejidos con diferentes fármacos, en corteza cerebral e hipocampo.

En este caso, los efectos de los fármacos se evaluaron únicamente en animales jóvenes. El grupo control se compuso por tejido cerebral (corteza e hipocampo) procedente de ratas de 2 meses que fueron preincubados con solución Krebs-Ringer, en ausencia de fármacos.

1.1. Análisis del curso temporal de la acción de la tacrina

En una serie de experimentos preliminares y con el fin de establecer las condiciones óptimas de incubación para la realización de los ensayos *in vitro*, se realizaron las curvas del curso temporal de la acción de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico en las regiones cerebrales (corteza e hipocampo) en las que posteriormente se realizaron los experimentos.

Para ello se incubaron los tejidos con tacrina 1 μM a diferentes intervalos de tiempo (0, 10, 20, 30 y 60 minutos), en presencia de IBMX 1 mM e isoprenalina 10 μM . Seguidamente se determinaron los niveles de AMP cíclico alcanzados en cada uno de los tiempos de incubación.

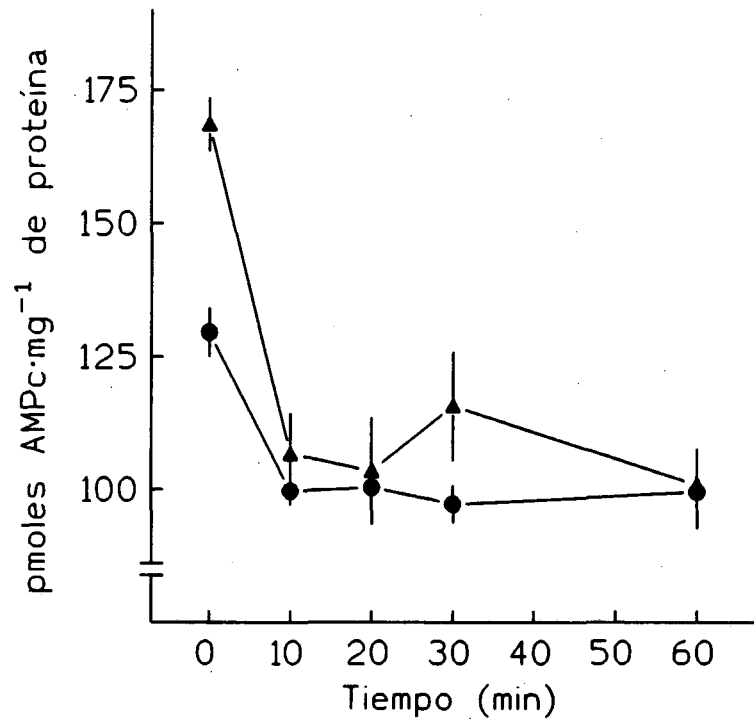


Figura 15. Curso temporal de la acción *in vitro* de la tacrina 1 μM sobre la acumulación de AMP cíclico acoplada a la estimulación del adrenoceptor β con una concentración supramaximal de isoprenalina (10 μM), en miniprismas de corteza cerebral (●) e hipocampo (▲) de rata. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M.

En estos ensayos observamos que la tacrina ($1\ \mu\text{M}$) reducía la acumulación de AMP cíclico activada por isoprenalina, alcanzando su efecto máximo transcurridos 10 minutos de incubación. La disminución de los niveles de AMP cíclico producida por la tacrina se mantenía durante por lo menos una hora (fig 15), sin que pudiera observarse el inicio de la recuperación. Por tanto, se determinó realizar una incubación de 10 minutos con tacrina para el estudio de su perfil farmacológico *in vitro*.

1.2. Curva concentración-respuesta de la tacrina

La siguiente serie de experimentos se diseñó con el fin de determinar si el efecto de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico estimulada por isoprenalina ($10\ \mu\text{M}$) era de carácter concentración dependiente. La incubación de los miniprismas de corteza cerebral con concentraciones crecientes de tacrina ($0.1\ \mu\text{M}$ - $0.1\ \text{mM}$) en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa, IBMX ($1\ \text{mM}$) y de isoprenalina ($10\ \mu\text{M}$), dió lugar a una disminución concentración-dependiente ($F = 24.87$, $p < 0.001$) de la formación de AMP cíclico estimulada por isoprenalina. En esta estructura cerebral la tacrina presentó una $\text{CI}_{50} = 0.77 \pm 0.13\ \mu\text{M}$ (fig 16).

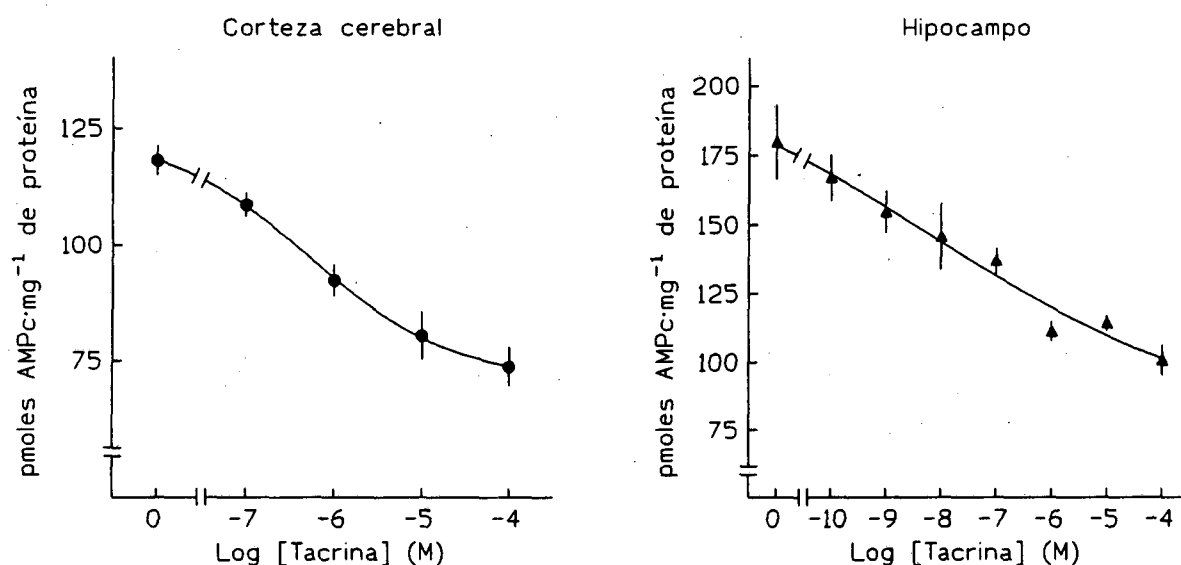


Figura 16. Curvas concentración-respuesta de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico estimulada por isoprenalina $10\ \mu\text{M}$, en miniprismas de corteza cerebral (●) e hipocampo (▲) de rata. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M.

En el hipocampo la tacrina (0.1 nM-0.1 mM), de nuevo, produjo una disminución significativa y de carácter concentración-dependiente de la formación de AMP cíclico estimulada por isoprenalina ($F = 11.80$, $p < 0.001$) (fig 16). Como en los casos anteriores en las estructuras hipocámpicas el fármaco resultó ser más potente como inhibidor ($CI_{50} = 0.032 \pm 0.003 \mu M$), que en corteza cerebral.

1.3. Influencia de la tacrina sobre la curva concentración-respuesta de la isoprenalina

Cuando los tejidos se incubaron con concentraciones crecientes de isoprenalina (0.1 μM -0.1 mM) se observó un aumento concentración-dependiente de la acumulación de AMP cíclico, tanto en la corteza cerebral ($F = 29.07$, $p < 0.001$) como en el hipocampo ($F = 23.27$, $p < 0.001$) (fig 17).

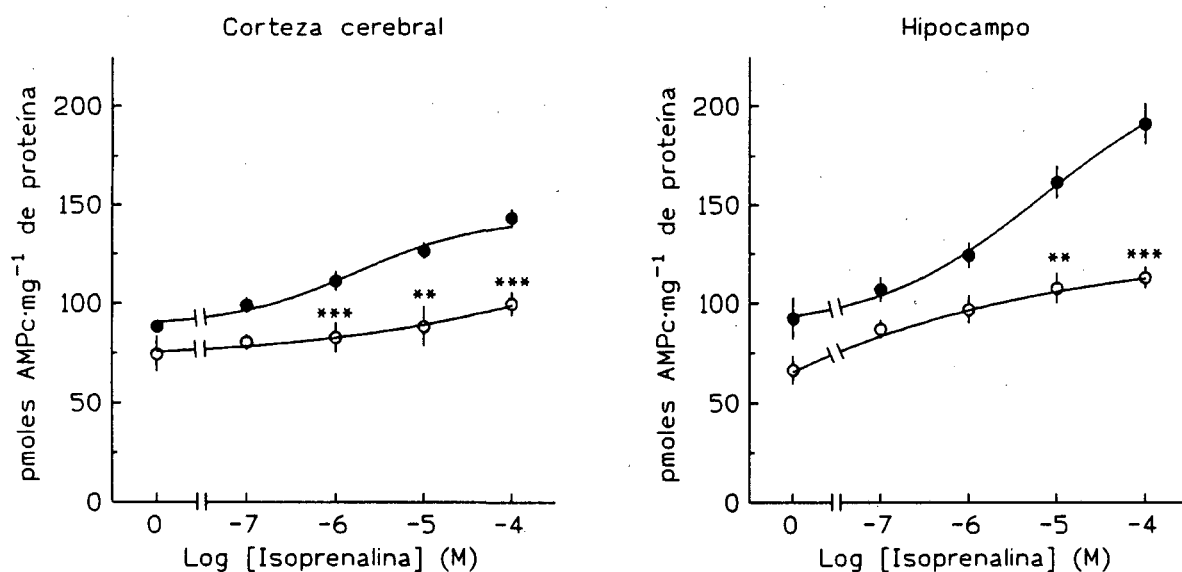


Figura 17. Acumulación de AMP cíclico estimulada por concentraciones crecientes de isoprenalina (0.1 μM -0.1 mM) en ausencia (●) o presencia de tacrina 1 μM (○), en miniprismas de corteza cerebral e hipocampo de rata. Valores expresados como media $\pm$ E.E.M. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En estos experimentos la preincubación de los miniprismas de corteza cerebral e hipocampo con tacrina $1\ \mu\text{M}$ durante 10 minutos, dió lugar a una pérdida progresiva del efecto estimulante de la isoprenalina sobre la activación de la adenilato ciclasa, que sufrió una disminución del efecto máximo alcanzado ($E_{\text{Máx}}$) de 143.22 ± 4.4 pmoles de $\text{AMPc} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína en ausencia de tacrina a 99.72 ± 5.9 pmoles de $\text{AMPc} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína en presencia de tacrina en la corteza cerebral (30.4% de pérdida de efecto máximo), mientras que en el hipocampo se pasó de un $E_{\text{Máx}} = 190.0 \pm 10.1$ pmoles de $\text{AMPc} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína en ausencia de tacrina, a un $E_{\text{Máx}} = 112.85 \pm 5.35$ pmoles de $\text{AMPc} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína en presencia de tacrina (disminución del 40.6%) (fig 17).

Al analizar la influencia de la tacrina sobre la curva concentración-respuesta de la isoprenalina, se observó que el fármaco indujo un desplazamiento hacia la derecha, de la curva de activación de la acumulación de AMP cíclico por acción de la isoprenalina que fue no paralelo, es decir, sin que hubieran modificaciones de la potencia de la isoprenalina, evaluada como concentración eficaz 50.

1.4. Efectos de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico estimulada por forskolina

Con el fin de determinar si los efectos de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico se debían a una acción directa a nivel de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, se analizó el efecto del fármaco sobre la formación de AMP cíclico estimulada por forskolina, en miniprismas de corteza cerebral e hipocampo de rata.

La incubación durante 10 minutos con concentraciones crecientes de forskolina ($0.1\ \mu\text{M}$ - $0.1\ \text{mM}$) indujo un marcado incremento, concentración-dependiente, de la formación de AMP cíclico en miniprismas de corteza cerebral ($F = 20.82$, $p < 0.001$) e hipocampo ($F = 12.36$, $p < 0.001$). El efecto máximo alcanzado fue de 157.68 ± 9.60 pmoles de AMP cíclico $\cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína en la corteza cerebral y de 221.03 ± 27.7 pmoles de AMP cíclico $\cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína en el hipocampo (fig 18).

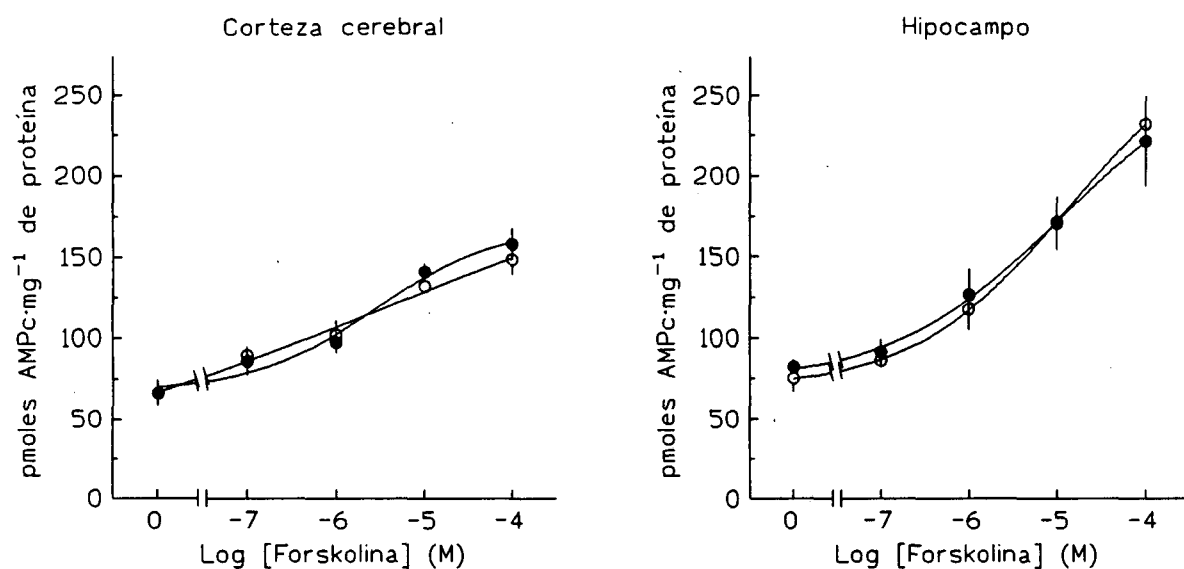


Figura 18. Acumulación de AMP cíclico estimulada por concentraciones crecientes de forskolina ($0.1 \mu\text{M}$ - 0.1 mM) en ausencia (●) o presencia de tacrina $1 \mu\text{M}$ (○), en miniprismas de corteza cerebral e hipocampo de rata. Valores expresados como media $\pm$ E.E.M.

En estos experimentos, la preincubación con tacrina $1 \mu\text{M}$ durante 10 minutos no modificó de manera significativa la capacidad de la forskolina para activar la formación de AMP cíclico, en ninguna de las estructuras cerebrales estudiadas, siendo el efecto máximo alcanzado en presencia de tacrina muy similar al obtenido en su ausencia (148.1 ± 9.27 pmoles de AMP cíclico· mg^{-1} de proteína en corteza cerebral y 231.7 ± 11.2 pmoles de AMP cíclico· mg^{-1} de proteína en hipocampo) (fig 18).

1.5. Análisis de la acción *in vitro* de la tacrina

La incubación durante 10 minutos con tacrina $1 \mu\text{M}$ no produjo modificaciones significativas de los niveles basales de AMP cíclico con respecto a los valores control, en ninguna de las estructuras cerebrales estudiadas. En esta serie experimental tampoco se apreciaron diferencias significativas en los niveles basales de AMP cíclico al comparar la corteza cerebral con el hipocampo (fig 19).

Observamos, asimismo, que la determinación de la acumulación basal de AMP cíclico en los animales control o tras la incubación con tacrina, fue similar a la obtenida en el grupo de animales empleados en la serie de experimentos realizados con tacrina *in vivo*, en ambas estructuras anatómicas (tabla 4).

En presencia de IBMX (1 mM) la acumulación de AMP cíclico aumentó significativamente en los animales control con respecto a los niveles basales (37.3%, $p < 0.001$ en corteza cerebral y 39.9%, $p < 0.02$ en hipocampo). Cuando se compararon los resultados de cada una de las estructuras cerebrales se observó que los niveles de AMP cíclico eran mayores en el hipocampo que en la corteza cerebral ($p < 0.05$) de los animales control (fig 19).

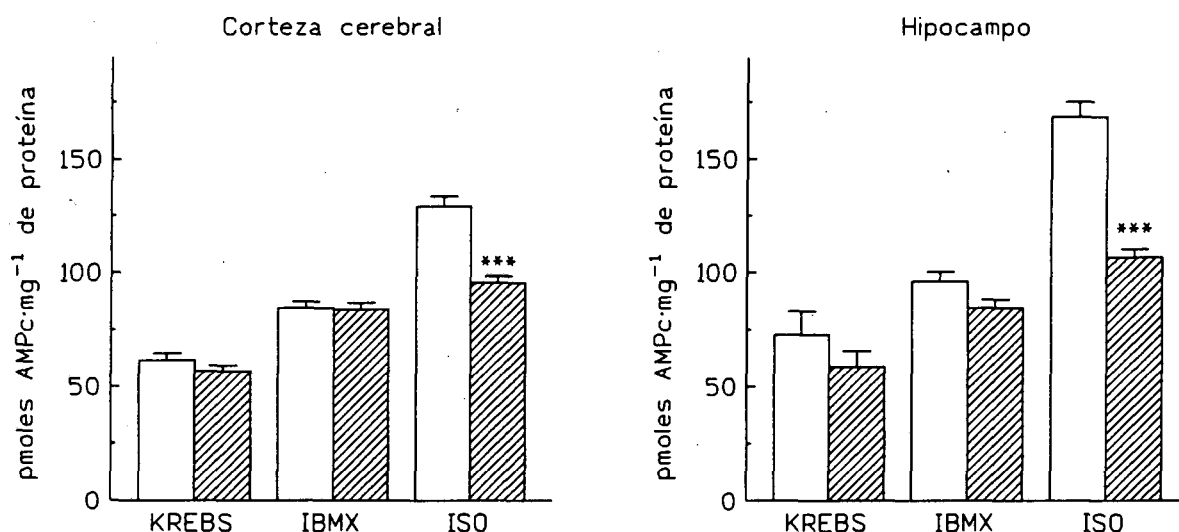


Figura 19. Acción *in vitro* de la tacrina (1 μ M) (barras diagonales) frente al control (barras blancas) sobre la acumulación de AMP cíclico en condiciones basal (KREBS) y después de la incubación con isoprenalina (10 μ M) (ISO) y/o IBMX (1 mM) en corteza cerebral e hipocampo de rata joven. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. *** $p < 0.001$ frente a los animales control.

En presencia de tacrina (1 μ M durante 10 minutos) la formación de AMP cíclico tras la inhibición de la fosfodiesterasa, también aumentó significativamente con respecto a los niveles basales (48.1%, $p < 0.001$ en la corteza cerebral y 44.2%, $p < 0.01$ en el hipocampo)

(fig 19). En estas condiciones experimentales, la tacrina no originó modificaciones significativas en los valores de la acumulación de AMP cíclico en ninguna de las dos regiones cerebrales estudiadas, cuando se compararon con los valores control (fig 19).

De nuevo, los valores de AMP cíclico obtenidos tras la inhibición de la fosfodiesterasa fueron similares a los observados en los experimentos realizados *in vivo* con animales de 2 meses (tabla 4).

Finalmente, cuando se estimuló la actividad adenilato ciclasa mediante la adición al medio de isoprenalina (10 μ M), se observó un marcado aumento de los niveles de AMP cíclico de los animales control tanto respecto a la acumulación basal como a los niveles obtenidos tras la inhibición de la fosfodiesterasa ($p < 0.001$ en ambos casos).

Cuando se compararon estructuras anatómicas, de nuevo fue el hipocampo la estructura más sensible, y por tanto donde el incremento resultó mayor ($p < 0.001$).

Tras la preincubación con tacrina 1 μ M durante 10 minutos, la adición al medio de isoprenalina 10 μ M indujo un aumento de los niveles de AMP cíclico con respecto a los valores basales, que resultó ser significativo en corteza cerebral e hipocampo ($p < 0.001$) y frente a los niveles obtenidos en presencia de IBMX ($p < 0.02$ en corteza cerebral y $p < 0.001$ en hipocampo). Sin embargo, en esta situación la tacrina (1 μ M) redujo la capacidad de la isoprenalina para estimular la adenilato ciclasa, apreciándose una disminución muy marcada de la acumulación de AMP cíclico con respecto a los valores obtenidos en el grupo control ($p < 0.001$ en ambas estructuras anatómicas). Cuando se comparó la acción del fármaco en cada una de las estructuras, se observó que tal como ocurría en los estudios *in vivo* los efectos de la tacrina fueron más marcados a nivel hipocámpico ($p < 0.001$) (fig 19).

También en esta situación experimental los niveles alcanzados tras la activación de la adenilato ciclasa a través de la estimulación del receptor β -adrenérgico, fueron similares a los obtenidos *in vivo* (tabla 4).

Tabla 4. Niveles de AMP cíclico en condiciones basales (KREBS) y después de la incubación con isoprenalina 10 μ M (ISO) y/o IBMX (1 mM) en corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes.

	CONTROL		TACRINA	
Corteza cerebral	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
KREBS	63.0 $\pm$ 2.5	61.5 $\pm$ 3.1	52.2 $\pm$ 1.8	56.6 $\pm$ 2.4
IBMX	87.9 $\pm$ 3.6	84.4 $\pm$ 2.9	74.5 $\pm$ 3.1	83.9 $\pm$ 2.9
ISO	116.2 $\pm$ 6.2	129.1 $\pm$ 4.6	87.7 $\pm$ 2.9	95.5 $\pm$ 2.8
	CONTROL		TACRINA	
Hipocampo	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
KREBS	83.7 $\pm$ 10.1	72.3 $\pm$ 10.4	58.9 $\pm$ 2.5	58.6 $\pm$ 7.1
IBMX	104.4 $\pm$ 6.20	96.1 $\pm$ 4.3	74.6 $\pm$ 4.5	84.5 $\pm$ 3.5
ISO	190.8 $\pm$ 12.4	168.6 $\pm$ 6.5	100.9 $\pm$ 8.6	106.6 $\pm$ 3.7

Los valores se expresan como pmoles de AMP cíclico formado $\cdot$ mg⁻¹ de proteína (media $\pm$ E.E.M).

In vivo = Animales jóvenes (2 meses) tratados con solución salina (1 mL $\cdot$ kg⁻¹ i.p.) (control) o tacrina (2.5 mg $\cdot$ kg⁻¹), 30 minutos antes de ser sacrificados para determinar los niveles de AMP cíclico.

In vitro = Tejidos procedentes de animales de 2 meses, preincubados durante 10 minutos con solución Krebs-Ringer (control) o con tacrina 1 μ M.

1.6. Análisis de la participación del sistema colinérgico en la acción de la tacrina

1.6.1. Efecto diferencial de fisostigmina y tacrina

Con el fin de comprobar si el efecto de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico acoplada al adrenoceptor β era específico de este fármaco o podía deberse en parte a su capacidad inhibidora de la acetilcolinesterasa, se realizó una curva de inhibición de la formación de AMP cíclico estimulada por isoprenalina $10 \mu\text{M}$ en presencia de concentraciones crecientes ($0.1 \mu\text{M}$ - 0.1 mM) de un potente anticolinesterásico, con efectos sobre la retención, como es la fisostigmina.

En esta serie experimental se pudo observar que ni en corteza cerebral ni en hipocampo de rata la fisostigmina era capaz de modificar la acumulación de AMP cíclico producida por la estimulación del receptor β -adrenérgico con una concentración supramaximal de isoprenalina ($10 \mu\text{M}$) ($F = 0.52$, $p > 0.05$ en corteza cerebral y $F = 2.31$, $p > 0.05$ en hipocampo) (fig 20).

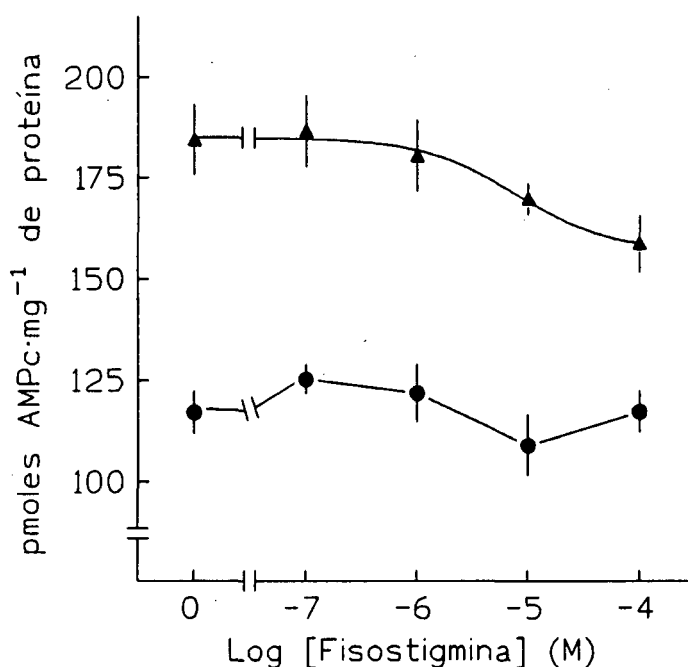


Figura 20. Curvas concentración-respuesta de la fisostigmina ($0.1 \mu\text{M}$ - 0.1 mM) sobre la acumulación de AMP cíclico estimulada por isoprenalina $10 \mu\text{M}$, en miniprismas de corteza cerebral (●) e hipocampo (▲) de rata. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M.

En la siguiente serie de experimentos, se analizó la posible aditividad o cooperatividad en el efecto de la tacrina y la fisostigmina. En una primera fase se analizó la acción *in vitro* de la fisostigmina en las tres situaciones experimentales planteadas de forma rutinaria en este trabajo. A continuación se estudió si la incubación secuencial con tacrina y fisostigmina producía modificaciones respecto a los niveles de AMP cíclico obtenidos en situación control o tras la incubación con tacrina sola.

Al analizar la acumulación basal de AMP cíclico, se comprobó que la incubación con fisostigmina a una concentración $1\ \mu\text{M}$ no modificaba los niveles basales de AMP cíclico (54.4 ± 4.3 pmoles de AMP cíclico $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína en corteza cerebral, 71.3 ± 8.7 pmoles de AMP cíclico $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína en hipocampo) al compararlos con los valores control (tabla 4) ni en corteza cerebral ni en hipocampo (fig 21).

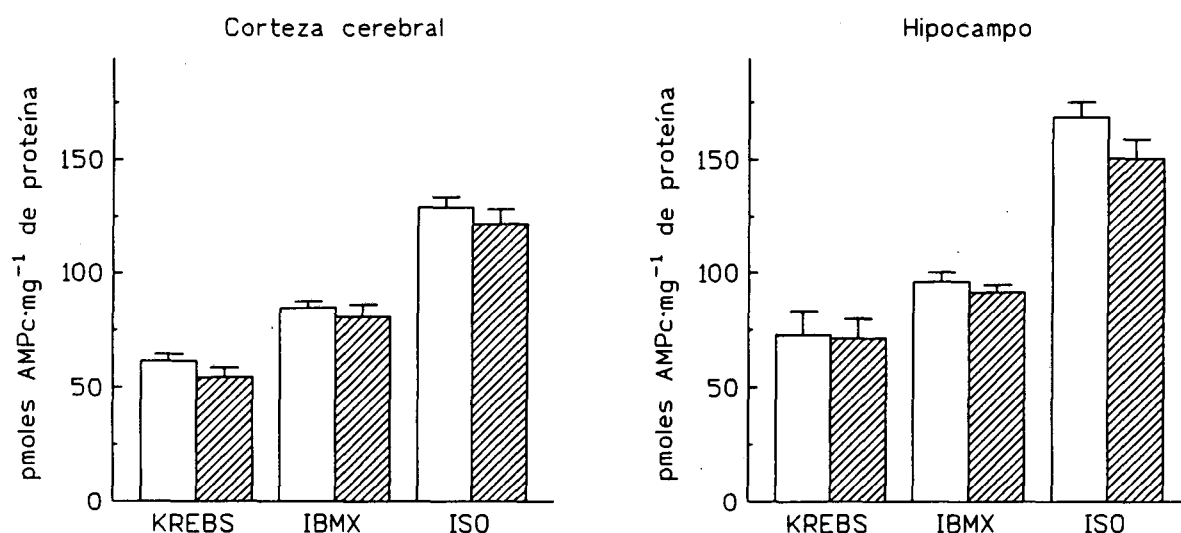


Figura 21. Efecto *in vitro* de la fisostigmina ($1\ \mu\text{M}$) (barras diagonales) frente al control (barras blancas) sobre la acumulación de AMP cíclico en condiciones basal (KREBS) y después de la incubación con isoprenalina ($10\ \mu\text{M}$) (ISO) y/o IBMX ($1\ \text{mM}$) en corteza cerebral e hipocampo de rata joven. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M.

En presencia de IBMX $1\ \text{mM}$, la acumulación de AMP cíclico aumentó de manera significativa con respecto a los niveles basales, tanto en corteza cerebral ($p < 0.01$) como en hipocampo ($p < 0.05$). En estas condiciones, la fisostigmina no modificó los niveles del

segundo mensajero (80.7 ± 5.2 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en corteza cerebral y 91.4 ± 3.2 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en hipocampo) cuando se compararon con la situación control (tabla 4), en ninguna de las estructuras cerebrales estudiadas (fig 21).

Finalmente, la activación de los adrenorreceptores β con isoprenalina (10 μ M) produjo un aumento significativo de la acumulación de AMP cíclico con respecto a la situación basal, tanto en corteza cerebral como en hipocampo ($p < 0.001$ para ambas estructuras). De nuevo, en esta situación, la incubación con fisostigmina 1 μ M no originó modificaciones significativas de este valor (121.7 ± 6.4 y 150.4 ± 8.4 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en corteza cerebral e hipocampo respectivamente) al compararlo con los controles (fig 21).

Cuando se estudió la posible interacción entre la tacrina y la fisostigmina, se apreció que tras la incubación secuencial con ambos fármacos los niveles de AMP cíclico alcanzados en situación basal (56.9 ± 2.4 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en corteza cerebral y 72.22 ± 7.2 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en hipocampo) no diferían ni de la situación control ni de los valores alcanzados tras la incubación con tacrina (tabla 4), en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas (fig 22).

La acción de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico en presencia de IBMX, no sufrió modificaciones tras la incubación secuencial con fisostigmina en corteza cerebral (80.3 ± 2.5 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína). Sin embargo, en el hipocampo la acción de la tacrina resultó parcialmente antagonizada por la fisostigmina, de forma que la incubación conjunta con ambos fármacos provocó un incremento significativo de la acumulación de AMP cíclico ($p < 0.05$) (99.7 ± 6.5 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína) en comparación con el efecto obtenido por la tacrina (84.5 ± 3.5 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína) hasta alcanzar valores similares a los obtenidos en la situación control (96.1 ± 4.3 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína (fig 22).

Por último, cuando se estimuló la actividad adenilato ciclasa a nivel del adrenoreceptor β con una concentración supramaximal de isoprenalina (10 μ M), se observó que en corteza cerebral la acumulación de AMP cíclico disminuyó hasta valores que no resultaron ser

significativamente distintos de los conseguidos cuando la incubación tuvo lugar únicamente con tacrina (95.5 ± 2.8 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ proteína cuando se incubó sólo con tacrina, frente a 102.8 ± 3.16 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ proteína cuando se incubó con ambos fármacos). Sin embargo, la acumulación de AMP cíclico fue en este caso inferior ($p < 0.001$) a la alcanzada en situación control (129.1 ± 4.6 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína), siendo también inferior ($p < 0.05$) al valor obtenido cuando la incubación se realizó sólo con fisostigmina (121.7 ± 6.4 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína). Por el contrario, en lo que respecta al hipocampo, la incubación de los miniprismas con los dos anticolinesterásicos dió lugar a una reversión del efecto de la tacrina ($p < 0.01$), hasta alcanzar unos niveles próximos a los conseguidos en situación control o tras la incubación con fisostigmina (156.2 ± 6.7 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína, cuando se incubó con fisostigmina y tacrina frente a 168.6 ± 6.5 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en situación control y 150.4 ± 8.4 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína al incubar con fisostigmina 1μ M) (fig 22).

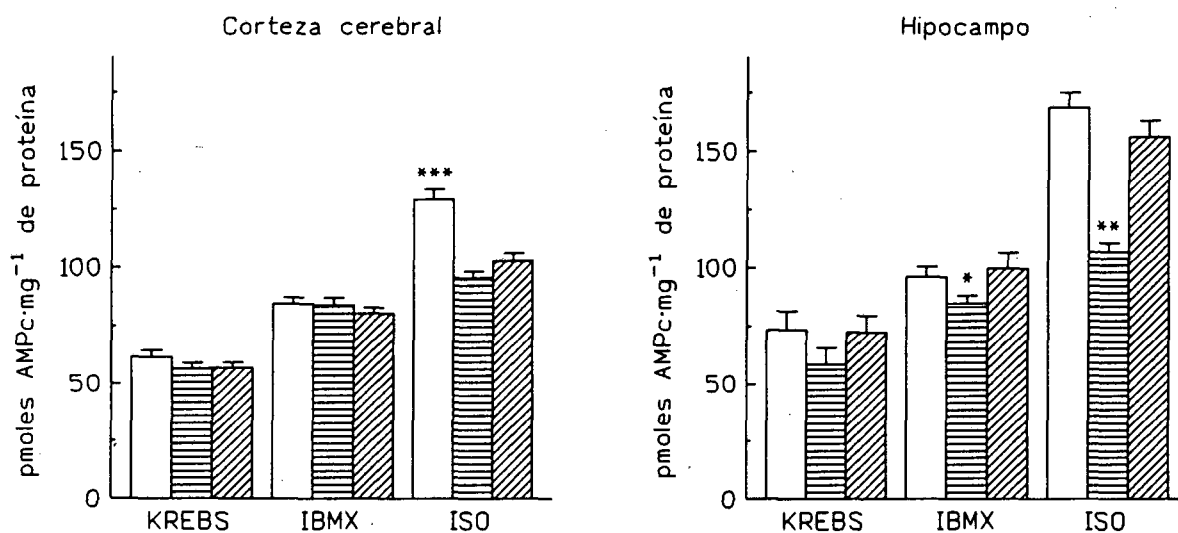


Figura 22. Análisis de la interacción entre fisostigmina y tacrina (1μ M ambas) (barras diagonales) frente al control (barras blancas) y a la acción de tacrina (1μ M) (barras horizontales) sobre la acumulación de AMP cíclico en condiciones basal (KREBS) y después de la incubación con isoprenalina (10μ M) (ISO) y/o IBMX (1 mM) en corteza cerebral e hipocampo de rata joven. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto a la combinación de fisostigmina más tacrina.

1.6.2. Influencia de la atropina en el efecto de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico

Dada la interacción existente a nivel del sistema nervioso central entre los sistemas de neurotransmisión colinérgico y noradrenérgico, y puesto que se ha descrito que la tacrina presenta cierta afinidad frente a los receptores de la acetilcolina del tipo muscarínico (Hunter y cols, 1989), la siguiente serie experimental se dirigió a descartar una posible acción indirecta de la tacrina mediada por estos receptores.

En una fase experimental previa, se ensayó la posible influencia de la atropina, un antagonista muscarínico, sobre la formación de AMP cíclico acoplada a la activación del adrenoceptor β . A continuación, se estudió la influencia del bloqueo de los receptores muscarínicos en la acción de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico.

En principio se observó que la atropina por sí misma no era capaz de modificar la acumulación de AMP cíclico (fig 23) ni en situación basal (59.1 ± 2.1 y 75.2 ± 4.45 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en corteza cerebral e hipocampo, respectivamente) ni tras la inhibición de la fosfodiesterasa con IBMX 1 mM (91.4 ± 3.1 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en corteza cerebral y 98.9 ± 1.8 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en hipocampo) o tras la activación de la adenilato ciclasa por la estimulación del receptor β -adrenérgico con isoprenalina 10 μ m (123.4 ± 3.6 y 158.1 ± 5.8 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en corteza cerebral e hipocampo) frente a los valores control (ver tabla 4).

Cuando se estudió la influencia de la preincubación con atropina sobre el efecto de la tacrina se observó que el bloqueo de los receptores muscarínicos no alteraba el efecto de la tacrina sobre la formación basal de AMP cíclico (55.9 ± 3.3 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en corteza cerebral y 75.33 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en hipocampo) ni el alcanzado al inactivar la fosfodiesterasa con IBMX (82.73 ± 3.4 y 95.5 ± 3.3 pmoles de AMP cíclico $\cdot$ mg⁻¹ de proteína en corteza cerebral e hipocampo, respectivamente), en ninguna de las estructuras cerebrales estudiadas (fig 24).

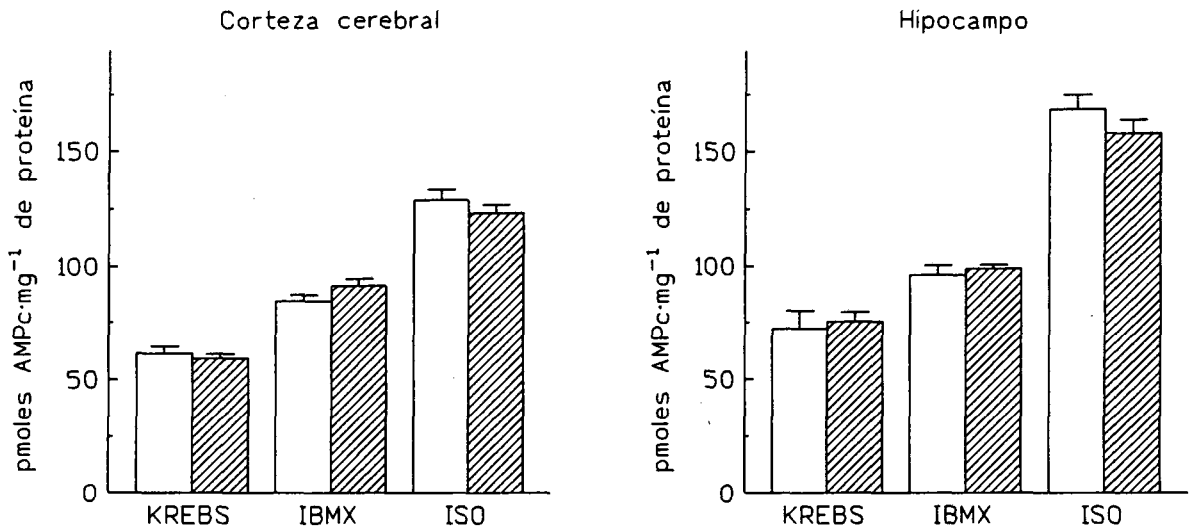


Figura 23. Acción *in vitro* de la atropina ($10\ \mu\text{M}$) (barras diagonales) frente al control (barras blancas) sobre la acumulación de AMP cíclico en condiciones basal (KREBS) y después de la incubación con isoprenalina (ISO) ($10\ \mu\text{M}$) y/o IBMX ($1\ \text{mM}$) en corteza cerebral e hipocampo de rata joven. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M.

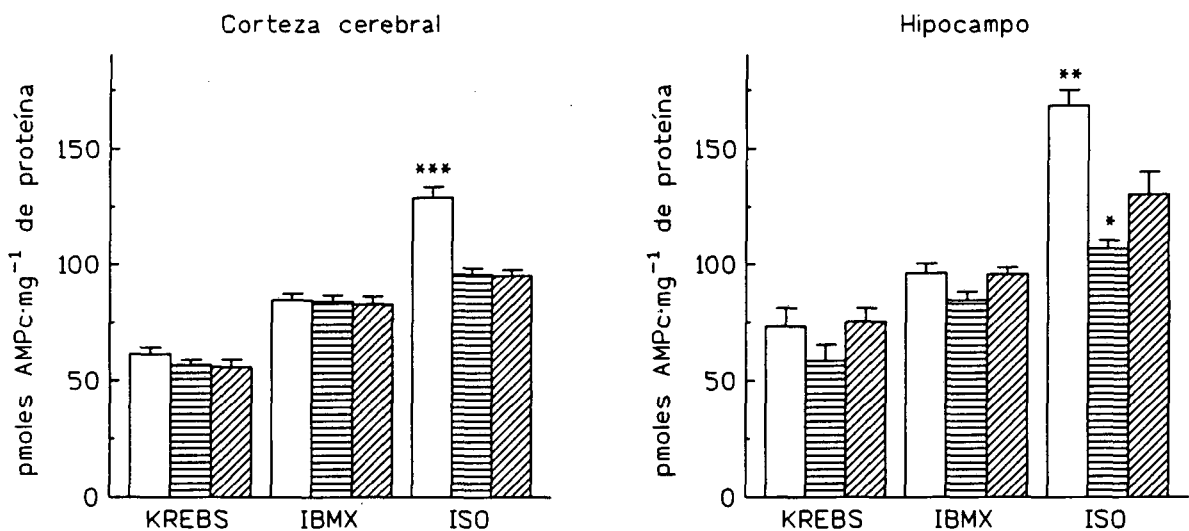


Figura 24. Influencia de la atropina ($10\ \mu\text{M}$) sobre la acción de la tacrina ($1\ \mu\text{M}$) (barras diagonales) frente al control (barras blancas) y a la acción de tacrina ($1\ \mu\text{M}$) (barras horizontales) sobre la acumulación de AMP cíclico en condiciones basal (KREBS) y después de la incubación con isoprenalina (ISO) ($10\ \mu\text{M}$) y/o IBMX ($1\ \text{mM}$) en corteza cerebral e hipocampo de rata joven. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto a la combinación de atropina más tacrina.

Finalmente, cuando se analizó la posible interacción entre ambos fármacos tras la incubación con una concentración supramaximal de isoprenalina ($10\ \mu\text{M}$), se observó que en corteza cerebral no se producían modificaciones de los niveles del segundo mensajero (95.3 ± 2.5 pmoles de AMP cíclico $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) en comparación con los valores obtenidos tras la incubación con tacrina $1\ \mu\text{M}$ (95.5 ± 2.8 pmoles de AMP cíclico $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína).

Sin embargo, la atropina $10\ \mu\text{M}$ previno parcialmente el efecto de disminución en la acumulación de AMP cíclico provocado por la tacrina en el hipocampo (130.4 ± 9.8 pmoles de AMP cíclico $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína tras la incubación con ambos fármacos). En esta estructura anatómica se obtuvieron unos valores que resultaron ser significativamente distintos con respecto tanto a la situación control (168.6 ± 6.5 pmoles de AMP cíclico $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, $p < 0.01$) como a los niveles obtenidos tras la incubación con tacrina (106.6 ± 3.7 pmoles de AMP cíclico $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, $p < 0.02$) (fig 24).

2. ACCIONES DE LA TACRINA SOBRE LA ACUMULACIÓN DE AMP CÍCLICO ACOPLADA AL ADRENOCEPTOR α_1

En esta nueva serie experimental se analizó si la tacrina también presentaba efectos sobre la acumulación de AMP cíclico cuando ésta era estimulada a través de los receptores α_1 -adrenérgicos.

2.1. Curva concentración-respuesta de la noradrenalina

Se realizaron las curvas de acumulación de AMP cíclico con concentraciones crecientes de noradrenalina ($1\ \mu\text{M}$ - $0.1\ \text{mM}$), una vez bloqueado irreversiblemente el receptor β -adrenérgico con BAAM ($10\ \mu\text{M}$). Se observó un aumento concentración-dependiente de los niveles de AMP cíclico, tanto en corteza cerebral ($F = 7.65$, $p < 0.001$) como en hipocampo ($F = 6.54$, $p < 0.001$) (fig 25). En este caso, y al contrario de lo ocurría cuando se estimulaba la adenilato ciclasa a través del adrenoceptor β , los niveles alcanzados fueron significativamente más elevados en la corteza cerebral ($p < 0.001$) que en el hipocampo.

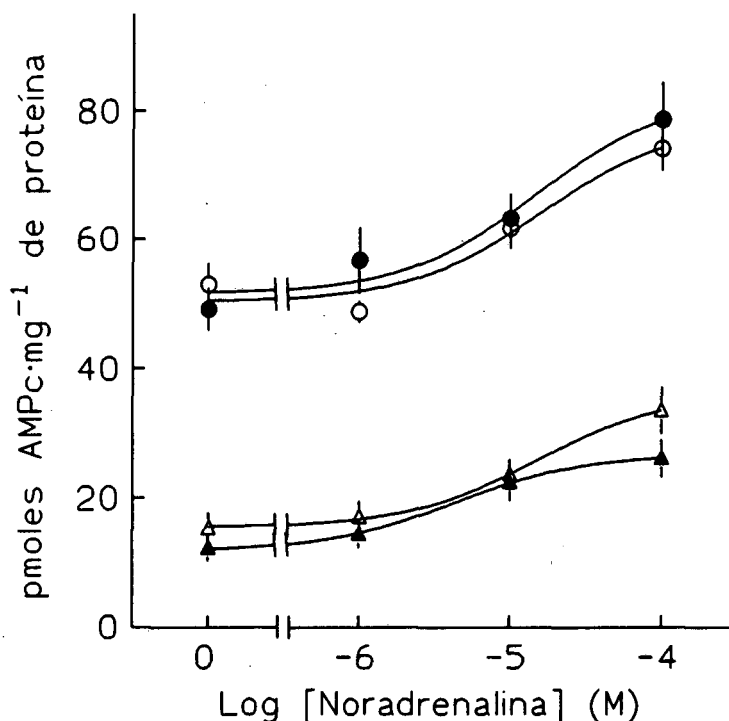


Figura 25. Acumulación de AMP cíclico estimulada por concentraciones crecientes de noradrenalina ($1 \mu\text{M}$ - 0.1 mM) en ausencia (símbolos negros) o presencia de tacrina $1 \mu\text{M}$ (símbolos blancos), en miniprismas en corteza cerebral (●) e hipocampo (▲) de rata, en los cuales se habían bloqueado previamente los adrenoceptores β con BAMM ($10 \mu\text{M}$). Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M.

2.2. Influencia de la tacrina sobre la curva concentración-respuesta de la noradrenalina

En una siguiente serie de experimentos se realizó una preincubación con tacrina $1 \mu\text{M}$ durante 10 minutos en miniprismas de corteza cerebral e hipocampo. De nuevo, tras la estimulación del receptor α_1 -adrenérgico con concentraciones crecientes de noradrenalina, se observó un aumento concentración-dependiente de los niveles de AMP cíclico, tanto en corteza cerebral ($F = 14.9$, $p < 0.001$) como en hipocampo ($F = 9.07$, $p < 0.001$). Cuando se compararon estructuras anatómicas, la corteza cerebral alcanzó unos niveles de AMP cíclico más elevados ($p < 0.001$) que los obtenidos en el hipocampo.

La incubación con tacrina ($1 \mu\text{M}$) no modificó el efecto estimulante de la noradrenalina sobre la activación de la adenilato ciclasa a nivel del adrenoceptor α_1 . Tampoco se produjeron alteraciones del efecto máximo alcanzado que fue de 78.74 ± 5.7 pmoles de AMP cíclico $\cdot \text{mg}^{-1}$ proteína en ausencia de tacrina a 74.3 ± 3.4 pmoles de AMP cíclico $\cdot \text{mg}^{-1}$ proteína en presencia de tacrina en la corteza cerebral mientras que en el hipocampo se pasó de un $E_{\text{Máx}} = 26.11 \pm 2.9$ pmoles de AMP cíclico $\cdot \text{mg}^{-1}$ proteína en ausencia de tacrina, a un $E_{\text{Máx}} = 33.5 \pm 3.6$ pmoles de AMP cíclico $\cdot \text{mg}^{-1}$ proteína en presencia de tacrina (fig 25).

3. ACCIÓN DE LA TACRINA SOBRE LA HIDRÓLISIS DE FOSFOINOSÍTIDOS ESTIMULADA POR NORADRENALINA

En esta nueva serie experimental se analizó el posible efecto *in vitro* del fármaco sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana acoplada al sistema de neurotransmisión α_1 -adrenérgico.

Con esta finalidad, los miniprismas procedentes de corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes, que habían sido marcados con [^3H]-inositol previamente, fueron preincubados en presencia o ausencia de una concentración de tacrina ($1 \mu\text{M}$) durante 10 minutos. A continuación se realizó la estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana con una concentración maximal de noradrenalina (0.1 mM).

Tanto en corteza cerebral como en hipocampo se observó un aumento significativo de la acumulación de fosfatos de inositol por acción de la noradrenalina ($p < 0.001$ en corteza cerebral y $p < 0.01$ en hipocampo). Sin embargo, cuando los miniprismas fueron preincubados con tacrina no se modificaron los valores alcanzados en la acumulación de fosfatos de inositol estimulados por noradrenalina (fig 26). En corteza cerebral se alcanzó un incremento del $719.5 \pm 55.6\%$ sobre el basal en ausencia de tacrina $1 \mu\text{M}$ frente al $860.6 \pm 70.8\%$ cuando los miniprismas se preincubaron con dicho fármaco, mientras que para el hipocampo los valores fueron $193.1 \pm 5.28\%$ en situación control y $207.5 \pm 13.55\%$ tras el tratamiento *in vitro* con tacrina $1 \mu\text{M}$.

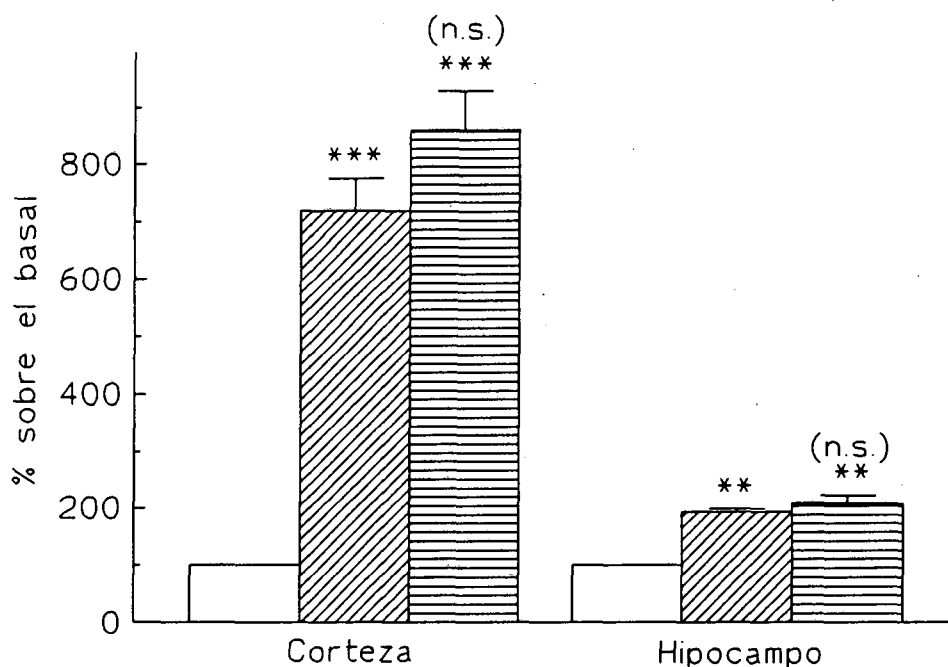


Figura 26. Acción *in vitro* de la tacrina ($1 \mu\text{M}$) (barras horizontales) sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana estimulada por noradrenalina (0.1 mM) (barras diagonales) en miniprismas de corteza cerebral e hipocampo de rata. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto a los valores basales (barras blancas). (n.s.) no significativo frente a la noradrenalina.

4. ACCIÓN DE LA TACRINA SOBRE LA RELAJACIÓN PRODUCIDA POR AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS EN CONDUCTO DEFERENTE DE RATA

En un principio pudimos constatar que la estimulación de campo mediante electrodos de platino de la porción prostática del conducto deferente de rata, con ondas cuadradas de frecuencias de estimulación bajas (0.1 Hz), duración de 1 ms y empleando un voltaje supramaximal ($30\text{-}40 \text{ V}$), producía contracciones regulares del tejido.

Este tipo de preparación permaneció estable, sin cambios en la tensión de reposo, manteniendo constantes las contracciones, durante todo el tiempo que duraron los experimentos. Finalmente, observamos que la tensión inicial desarrollada por la porción

prostática del conducto deferente de rata, tras la estimulación eléctrica de campo fue de 1056.1 ± 71.2 mg.

4.1. Curva concentración-respuesta de la isoprenalina

La adición al baño de órgano aislado de isoprenalina, una vez estabilizadas las contracciones, produjo una inhibición de la respuesta contráctil, que fue carácter concentración dependiente ($F = 104.4$, $p < 0.001$), obteniéndose unos valores de concentración eficaz 50 (CE_{50}) de $0.143 \pm 0.019 \mu M$ (fig 27). La inhibición máxima de la respuesta contráctil basal inducida por estimulación eléctrica fue de aproximadamente un 65% (tabla 5). Estas respuestas inhibitoras fueron revertidas por la adición de propranolol ($1 \mu M$), un antagonista de los adrenoceptores β , lo que confirmó que la inhibición por isoprenalina de la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico era debida a una acción sobre adrenoceptores β postsinápticos.

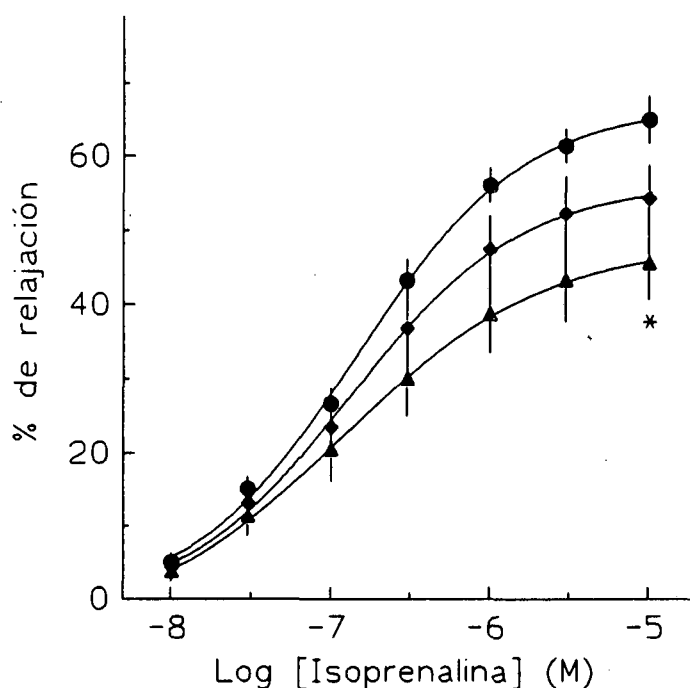


Figura 27. Efecto de la tacrina ($1-10 \mu M$) sobre la inhibición por isoprenalina de la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico de la porción prostática del conducto deferente de rata. Los valores se expresan como media $\pm$ E.E.M. * $p < 0.05$ respecto al valor control. (● control, ◆ tacrina $1 \mu M$, ▲ tacrina $10 \mu M$).

4.2. Influencia de la tacrina sobre la curva concentración-respuesta de la isoprenalina

Con el fin de estudiar los efectos de la tacrina sobre la funcionalidad del adrenoceptor β , se observó la influencia de dos concentraciones del fármaco sobre las curvas concentración-respuesta al agonista, isoprenalina.

En estos experimentos se pudo observar que la adición al baño de órgano aislado de una concentración de tacrina (1-10 μM) durante 10 minutos, inducía una disminución de la inhibición máxima de las contracciones producidas por estímulo eléctrico, provocada por la isoprenalina, si bien esta disminución de la respuesta al agonista fue significativa ($p < 0.05$) únicamente cuando se utilizó la concentración de tacrina más elevada (10 μM) (tabla 5, fig 27).

Tabla 5. Características de la inhibición por isoprenalina de la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico en la porción prostática el conducto deferente de rata. Efectos de diferentes concentraciones de tacrina sobre esta acción.

	CE_{50} (μM)	$\text{E}_{\text{Máx}}$ (%)	n
Control	0.143 ± 0.019	64.94 ± 3.28	16
Tacrina 1 μM	0.129 ± 0.016	54.23 ± 4.45	6
Tacrina 10 μM	0.112 ± 0.014	$45.54 \pm 4.88^*$	6

n = Número de experimentos.

CE_{50} = Concentración eficaz 50.

$\text{E}_{\text{Máx}}$ = Porcentaje de inhibición máxima de la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico.

Sin embargo, al analizar la acción del fármaco sobre la potencia de la isoprenalina para provocar la relajación de la respuesta contráctil estimulada eléctricamente, valorada como

concentración eficaz 50 (CE_{50}), observamos que la tacrina no produjo modificaciones de este parámetro con ninguna de las concentraciones empleadas (tabla 5).