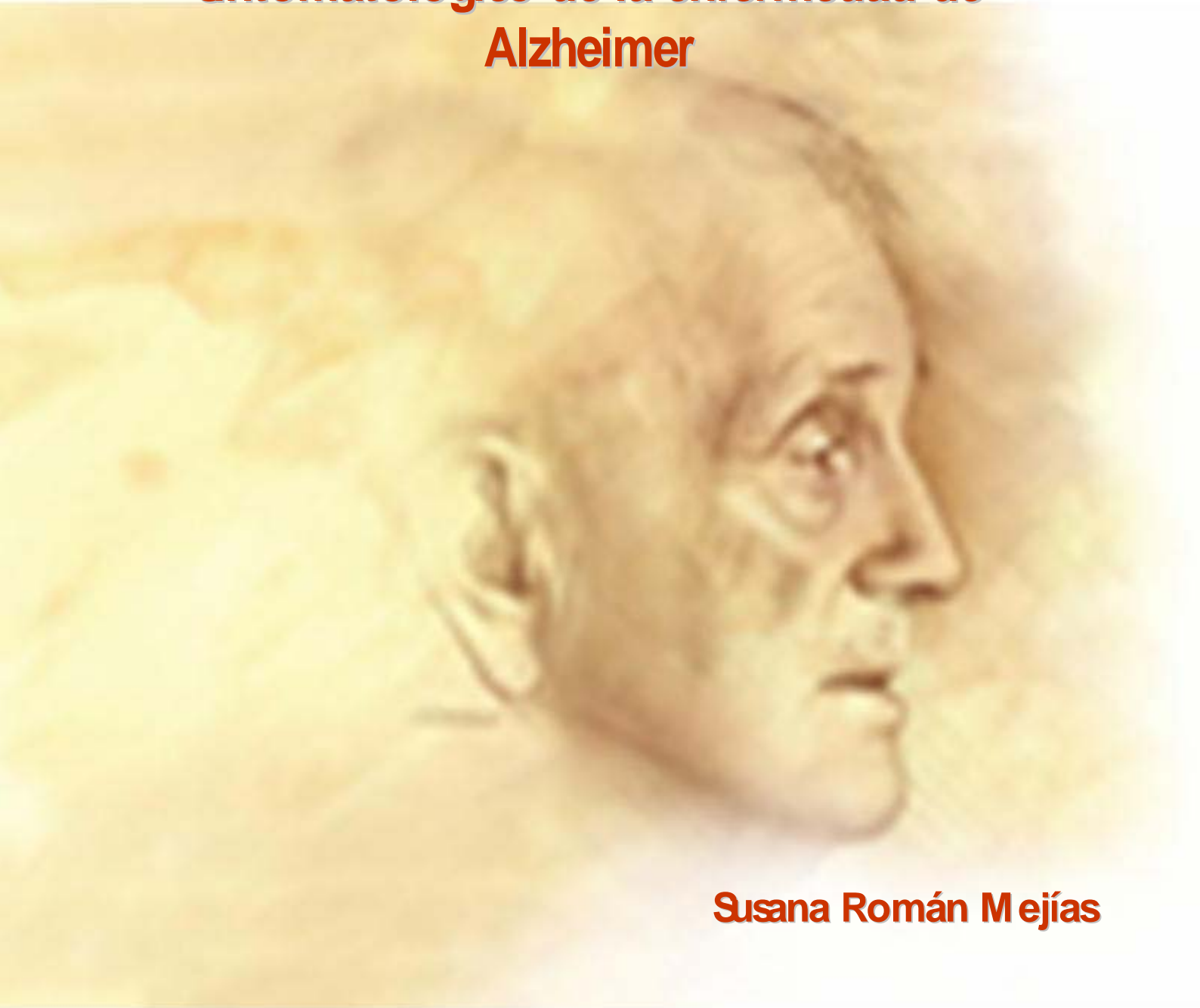


**Caracterización colinérgica de la (\pm) huprina X,
un anticolinesterásico híbrido tacrina-huperzina
A, con potencial interés para el tratamiento
sintomatológico de la enfermedad de
Alzheimer**



Susana Román Mejías

**Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de
Toxicología**
UNIVERSIDAD ATÓNOMA DE BARCELONA.

**Caracterización colinérgica de la (\pm)huprina X, un
anticolinérgico híbrido tacrina-huperzina A, con
potencial interés para el tratamiento sintomatológico de la
enfermedad de Alzheimer.**

**Tesis presentada por Susana Román Mejías para optar al
grado de Doctora por la Universidad Autónoma de
Barcelona.**

M^a Victoria Clos Guillen, Profesora titular del Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICA,

Que el trabajo de investigación llamado “**Caracterización colinérgica de la (\pm)huprina X, un anticolinesterásico híbrido tacrina-huperzina A, con potencial interés para el tratamiento sintomatológico de la enfermedad de Alzheimer**”, elaborado por Susana Román Mejías para optar al grado de Doctora, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona y reúne los requisitos necesarios para su defensa.

Y para que así conste, firmo este certificado en Bellaterra, 24 de Mayo de 2005.

M^a Victoria Clos Guillen

Agradecimientos

Ante todo, me gustaría dar las gracias por la ayuda y colaboración de la Dra. M^a Victoria Clos Guillen y el Dr. Albert Badía Sancho, durante mi paso por el departamento de Farmacología y en la realización de esta tesis.

Pero sobretodo quiero dar las más profundas gracias a Vicente y a Sagrario que me han aguantado lo indecible, en especial este último año, durante la redacción de esta tesis. A Jordi también muchas gracias, que aunque siempre me quejo, siempre me ayuda.

También gracias, a mis mejores compañeros de pesares en el departamento, Guido, M^a del Mar y Francesc.

Y claro está, por ser mi mejor amiga, por apoyarme en todas mis cuitas y por ser cómo una hermana para mi, a Laura.

Os quiero a todos y os agradezco de todo corazón el poder haberos tenido cuando me hizo más falta.

*“Todo el trabajo, por humilde que sea,
tiene un gran mérito. Y es el que uno
mismo le da.
Con eso es suficiente”*

Índice

1. Introducción.	1
2. Resumen de los resultados y discusión	53
2.1. Interacción de un nuevo y potente anticolinesterásico, la (±)huprina X, sobre los receptores muscarínicos, en cerebro de rata.	54
2.2. Efecto potenciador de la (±)huprina X, un nuevo inhibidor de la acetilcolinesterasa, sobre los receptores nicotínicos en sinaptosomas de corteza prefrontal de rata.	58
2.3. Los fármacos potenciadores de la respuesta nicotínica (±)huprina X y galantamina, incrementan la liberación de ACh a través del bloqueo de la actividad de la AChE, pero no actuando sobre los receptores nicotínicos.	63
2.4. Efecto de la acetilcolinesterasa sobre la agregación del péptido priónico PrP ₁₀₆₋₁₂₆ .	68
3. Artículos	78
3.1. Interaction of a new potent anticholinesterasic compound (±)huprine X with muscarinic receptors in rat brain.	79
3.2. Potentiation effects of (±)huprine X, a new acetylcholinesterase inhibitor, on nicotinic receptors in rat cortical synaptosoms.	83
3.3. Nicotinic-receptor potentiator drugs, (±)huprine X and galantamine, increase ACh release, by blocking AChE activity but not acting on nicotinic receptors.	90
3. Anexo	98
4.1. Prp106-126 miniprion aggregation induced by acetylcholinesterase	99
5. Conclusiones	114

1. Introducción



Índice

3. Aspectos generales de la enfermedad de Alzheimer.	4
4. Alteraciones neuropatológicas.	5
4.1. Cambios anatomopatológicos	5
2.1.1. Importancia de las placas seniles. La proteína β -amiloide.	6
2.1.2. Importancia de los ovillos neurofibrilares. La proteína tau.	7
4.2. Cambios fisiopatológicos.	10
4.2.1. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión. El sistema colinérgico y la hipótesis colinérgica.	11
4.2.2. Otros sistemas neuronales afectados en la enfermedad de Alzheimer	12
5. Estrategias terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer.	14
5.1. Relacionadas con la inhibición de la formación de la proteína β -amiloide.	15
5.2. Relacionados con la inhibición de la formación de los ovillos neurofibrilares.	18
5.3. Relacionados con la inhibición del estrés oxidativo.	19
5.4. Abordajes terapéuticos relacionados con la inhibición de la inflamación.	20
5.5. Relacionados con la actividad hormonal.	20
6. Cómo se ve afectado el sistema colinérgico por la Enfermedad de Alzheimer.	21

6.1.	Los receptores muscarínicos.	22
6.2.	Los receptores nicotínicos	24
6.3.	La acetilcolinesterasa. Fármacos inhibidores de la AChE	27
6.3.1.	Principales anticolinesterásicos usados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	31
6.3.2.	Efecto de los anticolinesterásicos sobre otros sistemas de Neurotransmisión	35
7.	Fármacos híbridos tacrina-huperzina A. Antecedentes	37
8.	Objetivos.	39
9.	Bibliografía	41

1. ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común entre las demencias existentes hoy en día, cursando con alteraciones cognitivas y neuropsiquiátricas (Ruiz-Nuño *et al.*, 1998). Durante el proceso normal de envejecimiento existe un declive de las funciones sensoriales y motoras, acompañado de una disfunción cognitiva leve (Corey-Bloom, 2002). Sin embargo, la demencia comprende un grupo de disfunciones caracterizadas por un deterioro gradual de las habilidades intelectuales, hasta el punto de originar graves problemas sociales (Dubois and Deweer, 1998). La prevalencia de los casos de demencia en personas de más de 80 años es de aproximadamente un 30% de la población, siendo la EA un 50-70% del total de los casos (Fernando and Ince, 2004).

Los factores de riesgo que predisponen a sufrir esta enfermedad no son bien conocidos. La evidencia más clara de que existe una contribución genética en la etiología de la EA es la existencia de familias en las cuales la enfermedad se transmite siguiendo un claro patrón autosómico dominante y dónde la aparición de la enfermedad se da en edades tempranas de entre los 35 y los 55 años (Campion and Brice, 1998; Roses, 2004). A pesar de esto, la mayoría de los casos de EA (> 95%) se dan a edades superiores de 60 años, por lo que se deduce que estas mutaciones representan sólo una pequeña contribución frente al riesgo general de desarrollar la enfermedad (Cummings, 1995). Relacionar la EA con un componente genético cuando ésta se desarrolla a una edad avanzada es complejo, ya que no sigue un patrón autosómico dominante, sino que más bien parece estar relacionada con una herencia poligénica multifactorial (Hsiung, *et al.*, 2004).

2. ALTERACIONES NEUROPATOLÓGICAS.

La EA se caracteriza por la presencia de graves alteraciones neurológicas tanto anatomopatológicas como fisiopatológicas (Corey-Bloom, 2002; Dubois and Deweer, 1998). Así, entre las primeras, se ha descrito una atrofia difusa y progresiva a nivel de la corteza cerebral con la presencia de placas extracelulares de material amiloide (placas seniles), además de ovillos neurofibrilares de proteína tau (τ) fosforilada y angiopatía amiloide (Rang *et al.*, 2003b). Como resultado de todo ello, existe una pérdida neuronal selectiva de las áreas de asociación y del sistema límbico manteniendo el resto de las áreas cerebrales prácticamente inalteradas (Dubois and Deweer, 1998). La pérdida de terminales sinápticos de tipo colinérgico, parece ser el último paso relacionado con la muerte neuronal.

En cuanto a las alteraciones fisiopatológicas, se ha observado que a nivel del neocórtex y el hipocampo hay una pérdida de gran número de neuronas, siendo las del sistema colinérgico las del grupo más afectado (Rang *et al.*, 2003a).

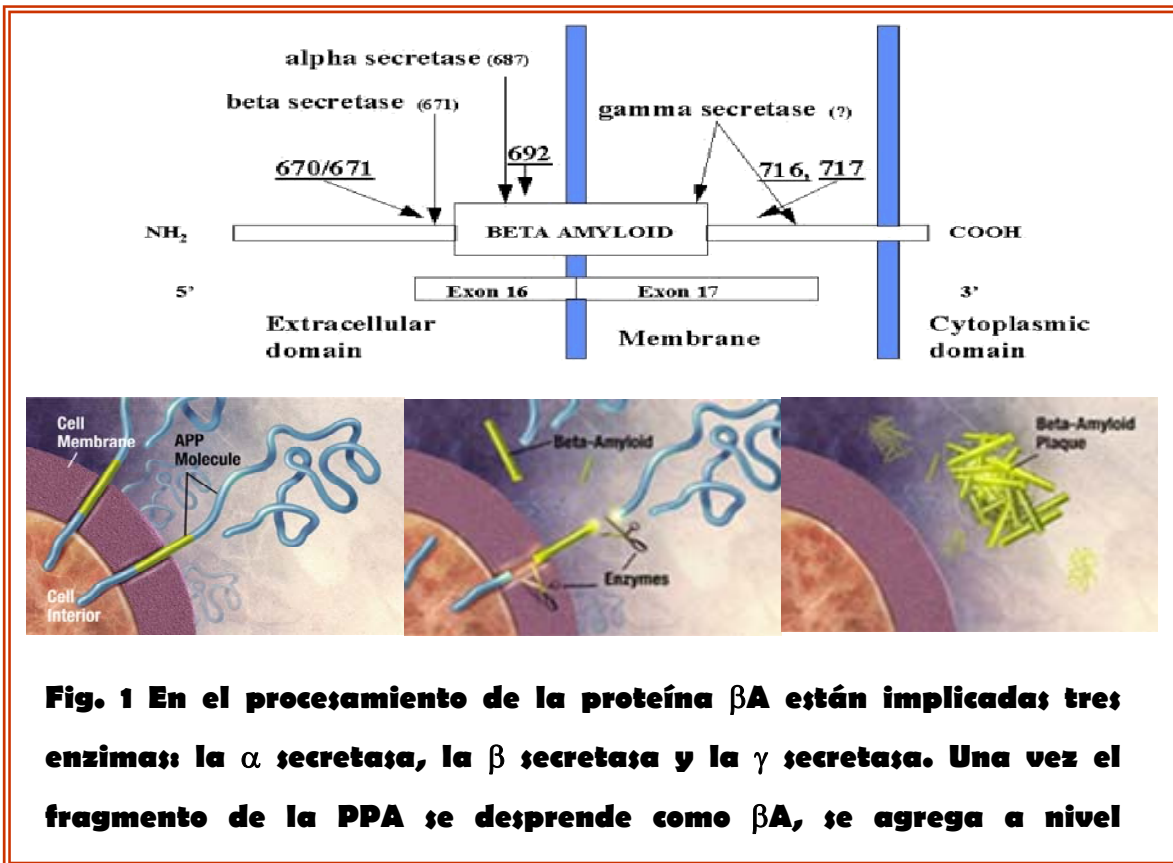
2.1. Cambios anatomopatológicos.

Los cambios anatomopatológicos que se observan en la EA son debidos principalmente a la formación y acumulación de la proteína β -amiloide y la proteína τ , aunque no todas las regiones cerebrales afectadas responden de la misma manera a estos cambios patológicos. Así, la proteína β -amiloide se deposita en regiones afectadas y no afectadas del cerebro, sin embargo solamente en las áreas de asociación y regiones límbicas, causa una reacción inflamatoria que es la responsable de la destrucción neuronal (Dudal *et al.*, 2004; Weiner and Selkoe, 2002).

2.1.1. Importancia de las placas seniles: la proteína β -amiloide.

Las placas seniles, también denominadas placas amiloides, son estructuras esféricas de 20-25 μ m de diámetro, localizadas principalmente en el espacio extracelular (Meyer-Luehmann *et al.*, 2003). Están formadas por conglomerados de cuerpos y prolongaciones neuronales degeneradas en torno a depósitos centrales de un péptido de longitud variable (29-43 aminoácidos) y de un peso de 4 a 6 kDa, llamado

proteína β -amiloide (β A) (DeKosky and López, 1998). En condiciones normales esta proteína es generada mediante la proteólisis del péptido precursor de la proteína



amiloide (PPA) por parte de la enzima α -secretasa siendo posteriormente secretada al espacio extracelular cómo una proteína soluble con conformación de hélice α (Esch *et al.*, 1990). Sin embargo, en pacientes con EA, la proteólisis de la PPA se lleva a cabo por otras secretasas, la β y la γ -secretasa, dando lugar a una nueva proteína, extracelular, pero en este caso insoluble, con conformación de hoja β plegada (DeKosky and López, 1998) (**fig 1**).

Este fragmento proteico tiene una gran tendencia a agregarse formando oligómeros insolubles que se depositan en el cerebro en forma de placas seniles y en las paredes de las arterias de mediano calibre, dando origen a la angiopatía amiloide. La presencia de placas seniles, no obstante, no sólo se observa en los enfermos afectados por la EA, sino que se ha descrito su presencia (así como la de ovillos neurofibrilares), aunque en bajas cantidades, en cerebros de individuos de edad avanzada sin signos

de demencia, en individuos con neuropatías tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (Armstrong *et al.*, 2001; Muramoto *et al.*, 1992) o en la diabetes tipo II, entre otras (Grossman, 2003).

Aunque la causa que provocan la agregación de la β A y la posterior formación de las placas seniles no es del todo conocida tampoco lo es el origen de su toxicidad aunque numerosos autores han sugerido el papel relevante del estrés oxidativo (Boyd-Kimball *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2000), las disfunciones en la homeostasis del calcio neuronal (Kim *et al.*, 2000) o los procesos inflamatorios (Dudal *et al.*, 2004) como origen de su toxicidad.

2.1.2. Importancia de los ovillos neurofibrilares: la proteína tau.

El segundo tipo de alteración observada en la EA es la degeneración neurofibrilar, caracterizada por la presencia de cúmulos de fibrillas en el citoplasma de las neuronas. A estas acumulaciones citoplasmáticas se les ha denominado ovillos neurofibrilares, y están compuestos principalmente por proteína τ altamente fosforilada (Johnson and Hartigan, 1998). Dicha proteína, en condiciones fisiológicas, está asociada a los microtúbulos celulares estabilizándolos y manteniendo, por lo tanto, el citoesqueleto neuronal (Ishiguro *et al.*, 1991).

En la EA, la proteína τ pierde su función fisiológica habitual debido a la anormal hiperfosforilación inducida por quinasas específicas (Ishiguro *et al.*, 1991). *In vitro*, se ha observado que una defosforilación inducida por fosfatasa, restablece las funciones normales de la proteína τ alterada (Bramblett *et al.*, 1993).

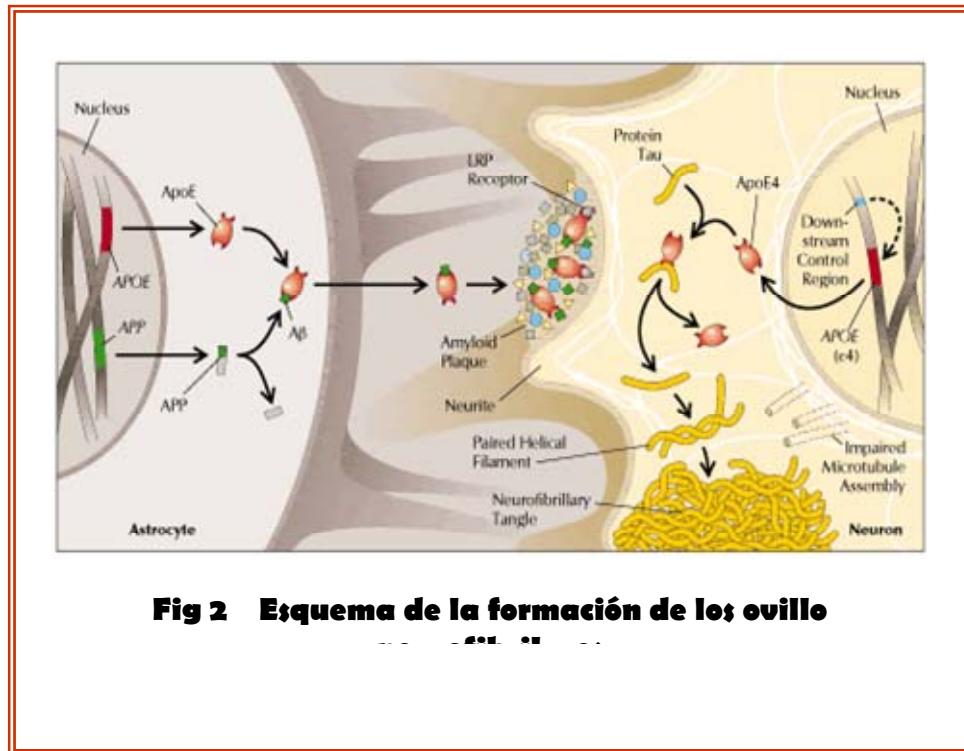


Fig 2 Esquema de la formación de los ovillo

La

actividad biológica de la proteína τ depende en gran manera del grado de hiperfosforilación que presenta (Johnson and Hartigan, 1998). Mientras la proteína τ normal promueve la agregación y el mantenimiento de los microtúbulos, la proteína hiperfosforilada secuestra la proteína normal junto con las proteínas asociadas normalmente a ésta (MAP1 y MAP2), impidiendo el correcto funcionamiento de la misma y causando la desunión de los microtúbulos (Li *et al.*, 2004).

Parece ser que el único sitio anormalmente hiperfosforilado es la Ser-262, el cual se cree que está estrechamente relacionado con la actividad de la proteína τ estabilizando los microtúbulos (Li *et al.*, 2004). Este hecho sería el responsable de la pérdida de funcionalidad de la proteína y de la disgregación de los microtúbulos, comprometiendo enormemente el transporte axonal de la célula y por lo tanto determinará, también, la neurodegeneración celular (Bramblett *et al.*, 1993). Esto induce una serie de alteraciones en el citoesqueleto de la neurona que implican la pérdida de ramificaciones dendríticas y la reducción del número de estructuras sinápticas, conduciendo finalmente a la muerte neuronal en distintas regiones cerebrales (Ishiguro *et al.*, 1991).

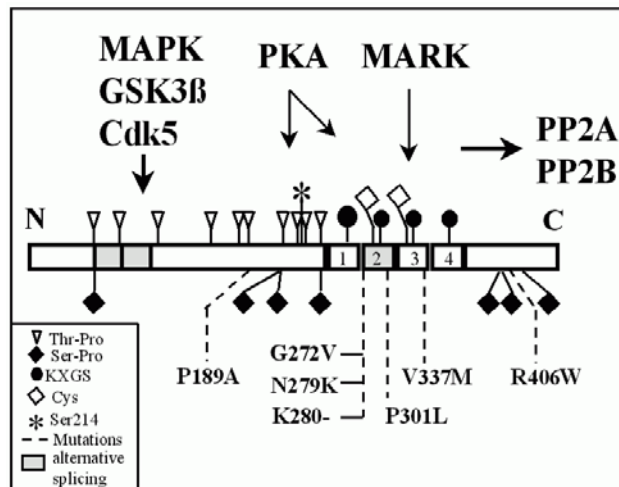


Fig. 3 En la EA la proteína τ pierde su función fisiológica debido a una anormal hiperfosforilación, inducida por, entre otras, la PKA, la MARK quinasa, etc., y a la hipofunción de la PP2A. Una disminución de la actividad de la PP2A y una anormal hiperfosforilación de la proteína τ pueden ser los responsables de la presencia de ovillos neurofibrilares en corteza cerebral.

Según algunos autores, una de las proteínas implicadas en la fosforilación de la proteína τ , es una enzima denominada quinasa de la proteína τ de tipo I (Ishiguro *et al.*, 1991; Planel *et al.*, 2001). La actividad de esta quinasa induciría la agregación de la proteína τ formando los ovillos neurofibrilares que son de naturaleza insoluble y de difícil degradación por acción de enzimas proteolíticos (**fig. 2**). Otras proteínas implicadas en la fosforilación de la proteína τ , son CaMKII, la PKA, la MARK quinasa, etc, las cuales también regulan la fosforilación de la proteína τ en condiciones normales (Bennechib *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2000) (**fig 3**). La actividad de estas quinastas, más concretamente la de la CaMKII está regulada por la protein fosfatas IIA (PP-2A) y en menor grado por la protein fosfatasa I (PP-I), cuya actividad en la EA y parece que está comprometida pudiendo ser ésta, otra de las causas de la hiperfosforilación de la proteína τ (Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1993). Debido a que la hiperfosforilación de la proteína τ parece darse antes que la agregación de la

proteína β A, éste se considera uno de los primeros signos de la degeneración neuronal en la EA (Rachakonda *et al.*, 2004).

2.2. Cambios fisiopatológicos.

Las alteraciones en los sistemas de neurotransmisión están estrechamente relacionadas con los cambios patológicos estructurales que ocurren en la EA. La conexión más evidente entre ambos es la muerte neuronal siendo las neuronas fuente de neurotransmisores y de sus sistemas de proyección (Rang *et al.*, 2003b; Ruiz-Nuño *et al.*, 1998). Algunos sistemas de neurotransmisión no se hallan afectados o el daño que sufren es imperceptible, indicando así un patrón de degeneración específico. Es característico de la EA que un sistema de neurotransmisión pueda verse afectado en unas áreas del cerebro y no en otras. Sucede así con el sistema colinérgico que se halla afectado de forma importante en el núcleo basal de Meynert (Rang *et al.*, 2003b) pero se halla relativamente preservado a nivel de los núcleos colinérgicos del tronco encefálico. Sin embargo, con la progresión de la enfermedad otros sistemas pueden verse así mismo afectados.

2.2.1. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión. El sistema colinérgico y la hipótesis colinérgica.

Dado que los cambios más relevantes en los sistemas de neurotransmisión se producen en el sistema colinérgico, se formuló lo que actualmente se denomina hipótesis colinérgica (Jones, 2003; Lane *et al.*, 2004; Terry and Buccafusco, 2003). El déficit colinérgico presente en la EA es el resultado de la pérdida masiva de neuronas especialmente en el neocórtex y en el hipocampo (DeKosky and López, 1998). Las terminaciones nerviosas de estas dos áreas se originan en el prosencéfalo basal, es decir, septo medial, banda diagonal de Broca y núcleo basal de Meynert. La pérdida de neuronas que se extiende por las áreas citadas, afectará particularmente al núcleo basal de Meynert (Rang *et al.*, 2003b).

Puesto que la etiología exacta de la EA no es del todo conocida, la hipótesis colinérgica, se estableció como base para desarrollar una terapia sintomática que consistiera en potenciar la función colinérgica en el sistema nervioso central (SNC) (Michaelis, 2003). En relación con esta hipótesis, se ha demostrado que en la EA existen deficiencias en la síntesis de la acetilcolina (ACh), en la actividad de la colina acetiltransferasa (CAT) y en la recaptación de colina (DeKosky and López, 1998). Además, se produce una reducción de la liberación de ACh así como una disminución de su catabolismo, ya que, en general, la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se halla reducida (Lane *et al.*, 2004). A todo ello hay que añadir, además, la pérdida de receptores nicotínicos (Court *et al.*, 2001) y la alteración en el sistema de transducción de los receptores muscarínicos M_1 (DeKosky and López, 1998).

Uno de los factores que determinan las lesiones patológicas que aparecen en el sistema colinérgico es la actividad de la βA . En los últimos años, algunos estudios relacionan a la proteína βA con la neurotransmisión colinérgica actuando como un potente modulador de la misma (Auld *et al.*, 1998; Kar *et al.*, 1996). Esta función asociada a la βA , se desarrolla de forma totalmente independiente de sus propiedades neurotóxicas (Auld *et al.*, 1998). Así, se ha podido demostrar que la βA es capaz de inhibir la liberación de ACh, reducir su concentración intracelular, además de reducir las actividades de la CAT y la piruvato deshidrogenasa y de disminuir la recaptación de colina. Parece ser que estos efectos son altamente selectivos y restringidos a la corteza cerebral y al hipocampo (Kar *et al.*, 1996). La proteína βA es capaz de bloquear y alterar la respuesta a la estimulación de los receptores colinérgicos, además de interferir en la expresión de los mismos (Auld *et al.*, 2002). Es de interés señalar que la interacción de la proteína βA con el sistema colinérgico es de tipo bidireccional ya que se ha observado que la estimulación de los receptores colinérgicos puede, a su vez, modificar la formación de esta proteína (ver en el apartado 3.1.) (Fisher *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2003; Hock *et al.*, 2003; Schöder and Wevers, 1998).

2.2.2. Otros sistemas neuronales afectados en la enfermedad de Alzheimer.

Sin embargo, la EA se puede considerar más que un desorden colinérgico, puesto que existen evidencias en las que se pone de manifiesto la interacción entre el sistema colinérgico y otros sistemas tales como el monoaminérgico que contribuyen, así, a la progresión de la enfermedad (Dringenberg, 2000; Palmer, 1996; Storga *et al.*, 1996; Umbricht, 2000; White and Cummings, 1996).

Se ha observado que si bien una lesión en las vías colinérgicas induce a una pérdida cognitiva y a una alteración en el trazado normal del electroencefalograma (EEG) (Dringenberg, 2000), ambas alteraciones son más evidentes cuando otros sistemas de neurotransmisión asociados al sistema colinérgico se hallan afectados. La sintomatología observada en la EA corresponde a un daño mucho más importante que el que correspondería a una lesión en las vías colinérgicas, por ello se puede pensar que en realidad la EA es debida a la alteración conjunta de diferentes sistemas de neurotransmisión, aunque lo más relevante sea el daño a nivel colinérgico (Dringenberg, 2000).

Existen diferentes datos sobre las alteraciones funcionales y estructurales en los sistemas monoaminérgicos (Storga *et al.*, 1996), como por ejemplo las que relacionan al sistema serotoninérgico (Buhot *et al.*, 2000), noradrenérgico (Regland, 1993) y dopaminérgico (Tanaka *et al.*, 2003) con la EA. El metabolismo de la serotonina que se halla alterado, así como su recaptación y su liberación (Francis *et al.*, 1994), disminuye a nivel de la corteza cerebral así como en otras áreas del SNC. El número de neuronas serotoninérgicas localizadas en el rafe disminuye aunque no de forma tan significativa como en el caso de las neuronas noradrenérgicas (Yamamoto and Hirano, 1985; Zweig *et al.*, 1988). Sin embargo, las neuronas serotoninérgicas supervivientes presentan grandes cantidades de ovillos neurofibrilares, hecho que está relacionado con la marcada agresividad y depresión que presentan algunos enfermos de EA (Lopez *et al.*, 1996).

Las alteraciones en el sistema noradrenérgico están relacionadas con cambios tanto cognitivos como no cognitivos (Matthews *et al.*, 2002). Analizando la concentración de receptores α_2 adrenérgicos mediante el uso de radioligandos, se ha observado que la densidad de los mismos, disminuye significativamente tanto en pacientes afectados por EA como por otras demencias. Además, paralelamente a la disminución de los adrenoreceptores α_2 , existe una reducción neuronal en el *locus coeruleus* sumadas a la

presencia de ovillos neurofibrilares en esa misma localización cerebral (Matthews *et al.*, 2002). En los pacientes con demencia existe una correlación positiva entre el comportamiento agresivo y la magnitud de la lesión celular localizada a nivel rostral del *locus coeruleus*. Por otra parte, la disminución en la concentración de noradrenalina correlaciona positivamente con el daño cognitivo que sufren estos pacientes.

Existen diferentes datos en relación con la modificación que sufre el sistema dopaminérgico en la EA. Así se ha descrito que si bien algunos pacientes presentan síntomas extrapiramidales (Mann *et al.*, 1980), no todos muestran una pérdida de neuronas dopaminérgicas o lesiones en las mismas (cuerpos de Lewy). Los pacientes de EA que muestran estas alteraciones se les diagnostica enfermedad de Parkinson o bien demencia por cuerpos de Lewy (lesiones en el área diencefálica y corteza cerebral) concomitante a la EA (DeKosky and López, 1998). Por otro lado, otros estudios relacionan la EA y el sistema dopaminérgico (Storga *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2003), dada la sintomatología esquizofrénica que presentan algunos pacientes (White and Cummings, 1996).

Según estudios *ante-mortem* y *post-mortem* realizados en cerebros humanos (Palmer, 1996), la pérdida de la inervación colinérgica, noradrenérgica y serotoninérgica a nivel cortical ocurre en los primeros estadios de la enfermedad, por el contrario la inervación dopaminérgica se mantiene inicialmente intacta y sólo se aprecia su alteración en etapas más avanzadas de la enfermedad (Palmer, 1996). La pérdida de inervación serotoninérgica, noradrenérgica (García-Alloza *et al.*, 2004; Lanctot *et al.*, 2001), dopaminérgica (Meguro *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2003) y en menor grado colinérgica, son mayoritariamente responsables de la sintomatología no cognitiva, mientras que el daño en el sistema colinérgico, está, en general, más relacionado con el déficit cognitivo. Sin embargo, síntomas no cognitivos de la EA como depresión, psicosis, comportamiento agresivo, hiperactividad o el comportamiento errático, también están relacionados con la lesión del sistema colinérgico (Minger *et al.*, 2000) aunque en menor grado.

3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

A pesar de que se está llevando a cabo una profunda y amplia investigación para llegar a un mejor conocimiento de esta enfermedad, actualmente se dispone de escasos recursos terapéuticos para su tratamiento (Michaelis, 2003). La hipótesis colinérgica, ha sido la que más opciones terapéuticas ha generado basándose en la corrección del deterioro cognitivo mediante la manipulación de este sistema de neurotransmisión (Cummings, 2000; Giacobinni, 1998). De todos los fármacos utilizados y sobre los que se ha investigado (Berkeley, 2003; Segura *et al.*, 2003; Terry and Buccafusco, 2003), los inhibidores de la acetilcolinesterasa (IChE) son los únicos que han demostrado una probada eficacia clínica (García *et al.*, 1998; Michaelis, 2003). Sin embargo, la mejora de los pacientes es sintomática y los beneficios obtenidos transitorios.

A pesar de la eficacia clínica de los IChE en el tratamiento de la EA, existen otros abordajes experimentales en desarrollo que tienen como objetivo obtener nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. Entender la etiología y la patogénesis, puede suponer la base del desarrollo de nuevas terapias para disminuir o frenar el progreso de las lesiones.

3.1. Relacionadas con la inhibición de la formación de la proteína β -amiloide.

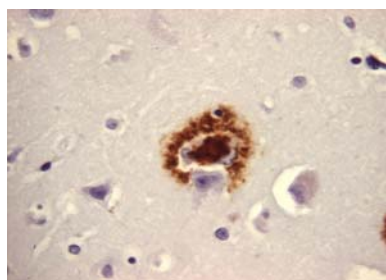


Fig 4 Estructura microscópica de la placa senil

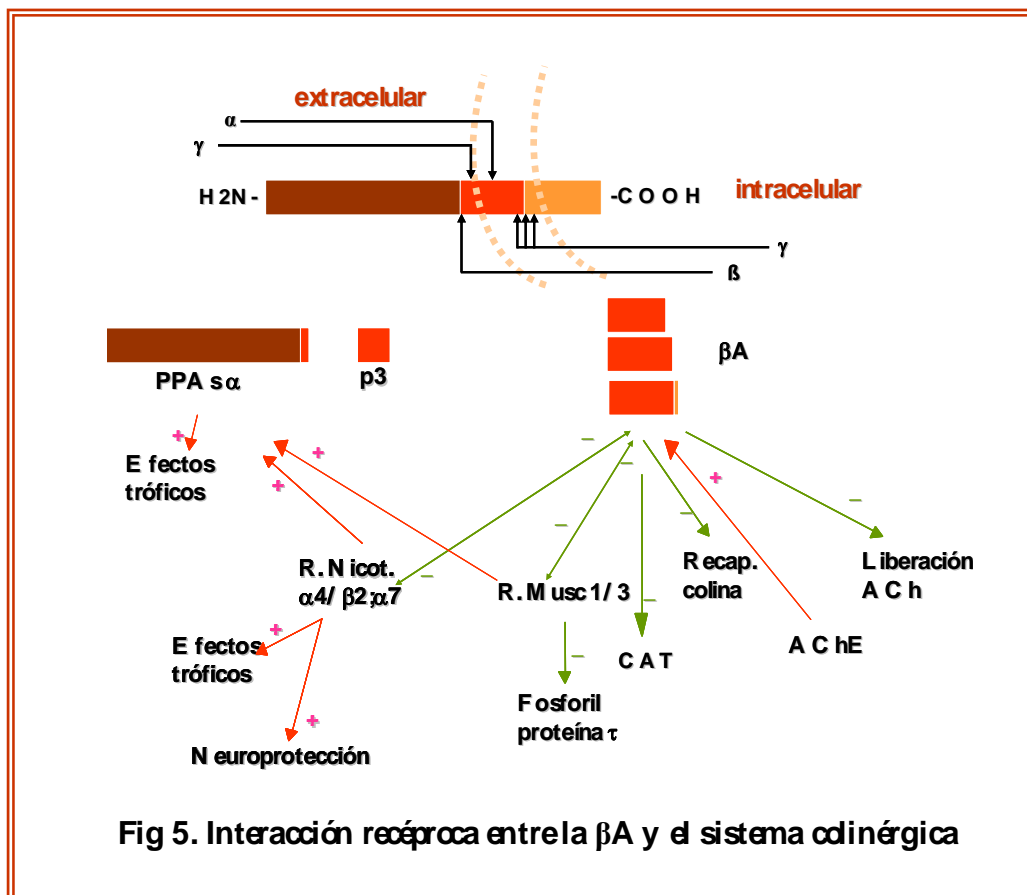
La acumulación de la proteína βA y la formación de placas seniles (**fig 4**) están directamente correlacionadas con la gravedad de la demencia que presentan los pacientes. La cascada de procesamiento de la PPA puede dar lugar a la producción de proteína βA_{1-42} , que es el fragmento de βA con mayor toxicidad y el mayor constituyente de las placas seniles (DeKosky and López, 1998). El bloqueo de la producción de la

βA_{1-42} es, por ello, un objetivo interesante con alto potencial terapéutico en la EA.

Cómo se ha comentado anteriormente, se conocen al menos tres enzimas (α , β y γ secretasa) relacionadas con el procesamiento de la PPA (DeKosky and López, 1998). La α -secretasa es la responsable del procesamiento no amiloidogénico de la PPA dando lugar a la formación de una proteína, sPPA α (**fig 5**), que presenta propiedades neuroprotectoras (Hooper and Turner, 2002). La estimulación de la actividad de la α - secretasa (estrógenos, testosterona, diversos neurotransmisores y factores de crecimiento además de los IChE), disminuyendo el metabolismo amiloidogénico de la PPA e incrementando la síntesis de un factor de neuroprotección como la sPPA α , puede suponer una aproximación terapéutica alternativa al tratamiento de la EA (Hooper and Turner, 2002).

Además de la inhibición en la formación de placas mediante la estimulación de la vía no amiloidogénica del procesamiento de la PPA, el uso de anticuerpos específicos para bloquear la actividad patológica de la proteína parece ser otra opción terapéutica (Bard *et al.*, 2000; Helmuth, 2000). Se ha demostrado que la inmunización en ratones transgénicos que sobreexpresan una de las formas mutantes asociadas a la EA del PPA humano, disminuye la formación de placas e induce la eliminación de las ya existentes (Bard *et al.*, 2000; Broymann and Malter, 2004). En este mecanismo estaría implicada la activación de las células de la microglía por parte de los anticuerpos frente a la proteína β A (Dudal *et al.*, 2004; Ferrer *et al.*, 2004). Los ensayos clínicos con pacientes humanos que habían desarrollado en un grado moderado la EA, no mostraron ninguna reacción adversa significativa en la fase I, mientras que se observaron algunos casos (5%) de reacción inflamatoria en el SNC (meningoencefalitis aséptica) durante la fase II (Nicoll *et al.*, 2003). Los esfuerzos por desarrollar una vacuna para la EA basada en la administración de anticuerpos contra la β A han dado, por lo tanto, resultados controvertidos (Monson and Weiner, 2003; Morgan *et al.*, 2000; Weiner and Selkoe, 2002).

Existen numerosos datos bibliográficos que relacionan directamente la actividad de los receptores nicotínicos y muscarínicos así como la de la AChE con cambios en la capacidad neurotóxica de la β A.



Los agonistas nicotínicos (**fig 5**) atenúan la toxicidad inducida por la proteína βA en cultivos neuronales, efecto que parece estar mediado específicamente a través de su interacción con los receptores nicotínicos (Liu and Zhao, 2004). La tacrina ha probado ser capaz de atenuar la toxicidad inducida por la βA_{25-35} en cultivos celulares mediante un mecanismo que parece estar relacionado con los receptores nicotínicos (Svensson, 2000). Así mismo la huperzina A ha mostrado poseer la capacidad de disminuir la toxicidad inducida por la βA_{1-40} , *in vivo*, reduciendo la pérdida de CAT y la neurodegeneración celular (Wang and Zhang, 2001).

Otra manera de influir sobre el procesamiento de la proteína β A es el uso de los agonistas muscarínicos (**fig 5**), para activar directamente dichos receptores y el uso de los IChE, mediante un mecanismo de acción indirecto, a través de la regulación del procesamiento y secreción de la PPA (Fisher *et al.*, 2003). Así, la estimulación colinérgica de los receptores muscarínicos M_1 y M_3 , produce un aumento en la secreción de PPA *in vitro* (Qiu *et al.*, 2003) y la inhibición a largo plazo de las colinesterasas (ChE) parece potenciar el procesamiento normal de la PPA en el cerebro de pacientes con EA, debido a dos factores, por un lado al aumento de los niveles sinápticos de ACh (Giacobini and Becker, 2004), y por otro debido a que la actividad de los IChE, como la tacrina o la fisostigmina, aumentan la liberación de PPA (Mori *et al.*, 1995).

Se ha observado que la enzima AChE (**fig 5**) se encuentra presente en los depósitos de proteína β A en la EA (Alvarez *et al.*, 1998). Parece claro que esta enzima puede acelerar la formación de la proteína β A como un potente agente amiloidogénico (Inestrosa and Alvarez, 1996), y jugar un papel muy importante en su deposición en los cerebros de pacientes con EA, hecho que está relacionado con la activación del locus periférico de la enzima (Campos *et al.*, 1998; De Ferrari *et al.*, 2001). Esto implica que la inhibición del sitio periférico de la AChE podría disminuir la deposición de proteína β A y por lo tanto la formación de placas seniles lo que conduciría a frenar la progresión de la enfermedad. En este sentido, la utilización de ligandos capaces de interactuar simultáneamente con el sitio catalítico y el sitio periférico, supondría una ventaja sobre el uso de cualquier otro inhibidor de la AChE conocido. Estos ligandos de acción dual presentarían una mayor potencia inhibidora sobre la enzima debido a su mayor afinidad por ésta y en consecuencia debido a una mayor eficacia en el tratamiento de la sintomatología de la EA y su mayor capacidad para retrasar el proceso de neurodegeneración.

3.2. Relacionadas con la inhibición de la formación de los ovillos neurofibrilares.

La hiperfosforilación anormal de la proteína τ contribuye a su propia agregación, que a su vez, está correlacionada con la severidad de la demencia. Los posibles

tratamientos para reducir la formación de ovillos neurofibrilares incluyen la inhibición de varias quinasas implicadas en la fosforilación de la proteína τ (Gong *et al.*, 1995; Bennechib *et al.*, 2001).

La memantina, un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), parece ser que reduce el deterioro clínico observado en casos moderados-leves de EA, al inhibir la actividad de las quinasas implicadas en la hiperfosforilación de la proteína τ (CaMKII, PKA, etc.) a través de la modulación de la actividad de la PP-2A. Memantina y PP-2A inhibirán y revertirán la degeneración neurofibrilar, inducida por la hiperfosforilación de la proteína τ (Li *et al.*, 2004). Todo ello conduce a una mejora sintomatológica que puede ser útil tanto para el tratamiento de la EA como de otras enfermedades relacionadas con la hiperfosforilación de la proteína τ .

3.3. Relacionadas con la inhibición del estrés oxidativo.

Se ha sugerido que el estrés oxidativo juega un papel crucial en la fisiopatología de la EA ya que se ha observado un aumento en la concentración de productos de la oxidación proteica y de la peroxidación lipídica en los tejidos post-mortem de sujetos con EA (Ames and Shigenaga, 1992). Ello es debido, posiblemente a un aumento de formación de radicales libres más que a una disminución de la actividad de los mecanismos antioxidantes del propio organismo (Parker and Davis, 1998). Corroborando el papel de la oxidación en el desarrollo de la enfermedad, se ha observado que ciertos compuestos antioxidantes pueden atenuar el estrés oxidativo provocado por la proteína β A. Así la selegilina, un inhibidor de la monoamino oxigenasa (MAO) con propiedades antioxidantes y la vitamina E, administradas juntas o por separado, parecen retrasar el avance de la enfermedad (Sano *et al.*, 1997).

Algunos estudios han relacionado a los estrógenos, que presentan ciertas propiedades antioxidantes, con un inferior riesgo de sufrir EA en mujeres post-menopáusicas (Dubois and Deweer, 1998). En la actualidad se están llevando a cabo estudios a largo plazo para determinar la capacidad de estos compuestos para cambiar el curso de la enfermedad (Cyr *et al.*, 2000; Vaffe *et al.*, 1998).

3.4. Relacionadas con la inhibición de la inflamación.

Se ha demostrado que existen cambios inflamatorios en el cerebro de los enfermos afectados por la EA (García-Menéndez *et al.*, 2002). Así existe un aumento de la concentración de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas del complemento, además de la presencia de la microglía activada (Chao and Hu, 1998). Datos epidemiológicos indican que el uso de fármacos antiinflamatorios esteroideos, como la prednisona y de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como el ibuprofeno, está asociado a una disminución del riesgo de la EA. Algunos AINE como el ibuprofeno (Tabet and Feldman, 2003) o el flubiprofeno (Eriksen *et al.*, 2003), han dado muestras a nivel experimental, de reducir la formación de la βA_{1-42} , limitando la producción de las placas seniles en ratones que sobreexpresan genes mutantes que causan la EA (Yan *et al.*, 2003) y la activación de la microglía de forma generalizada. No obstante, aunque la acción antiinflamatoria de estos AINE es debida a la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) y esta enzima parece ser que es responsable de la exacerbación de la neuropatología de la βA (Qin *et al.*, 2003), el bloqueo de la formación de la βA_{1-42} se realiza de forma directa sin la intervención de la COX, posiblemente mediante la inhibición de la γ -secretasa (Lim *et al.*, 2000).

3.5. Relacionadas con la actividad hormonal.

Varios estudios epidemiológicos señalan la posibilidad de que los estrógenos mejoren la función cognitiva y disminuyan el riesgo de sufrir EA en mujeres post-menopáusicas (Cyr *et al.*, 2000; Vaffe *et al.*, 1998). Los estrógenos estimulan la actividad de la CAT, participan en la señalización de las vías en las que interviene el factor de crecimiento neuronal (NGF), mantienen la estructura de las sinapsis, aumentan el flujo sanguíneo cerebral, estimulan la vía no amiloidogénica del procesamiento de la PPA y disminuyen la formación de proteína βA , todo ello *in vitro* (Xu *et al.*, 1998). Además algunos estudios han demostrado que los efectos neuroprotectores de ciertos estrógenos (17 β -estradiol), podrían estar mediados por el subtipo $\alpha 7$ del receptor nicotínico (Svensson *et al.*, 1997).

Se ha descrito, además, un efecto alostérico, sobre los receptores nicotínicos, por parte de los estrógenos. Así, se ha observado que la presencia de 17β -estradiol potencia la liberación de ACh debido a su acción sobre los receptores nicotínicos. Este efecto, que parece darse de forma rápida y eficaz (Curtis *et al.*, 2002), puede ser comparable al efecto alostérico que presentan algunos IChE sobre los receptores nicotínicos y del que se hará referencia más adelante.

Pero además, se ha demostrado que también la testosterona podría ejercer un papel protector en el avance de la enfermedad (Tan and Pu, 2003). De esta manera se sugiere, que la testosterona modula la función cognitiva a través de un incremento de la liberación de ACh y una regulación positiva de la expresión de los receptores nicotínicos. Tras la administración de testosterona, y mediante la utilización de pruebas de medición de la capacidad cognitiva, se puede observar una mejora del déficit cognitivo en pacientes con Alzheimer de tipo leve-moderado.

4. CÓMO SE VE AFECTADO EL SISTEMA COLINÉRGICO POR LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tal cómo se ha comentado en el apartado 2.2.1., la estrategia terapéutica basada en la hipótesis colinérgica constituye el principal punto de intervención farmacológica en la EA (Minger *et al.*, 2000). Si bien a nivel experimental, la administración de agonistas muscarínicos y nicotínicos han dado lugar a mejoras de la función del sistema colinérgico y a disminuciones de la sintomatología asociada a la EA (Dani, 2001; Fisher *et al.*, 2003; Larazeno *et al.*, 2002; Woodruff-Pak and Santos, 2000), los IChE, representan actualmente la estrategia terapéutica que mejores resultados ha proporcionado. A continuación se discute de forma detallada el papel de las distintas dianas colinérgicas en el tratamiento de la EA.

4.1. Los receptores muscarínicos.

Se han descrito cinco tipos de receptores muscarínicos, del M_1 al M_5 , todos ellos del tipo metabotrópico acoplados a proteínas G con una localización y una función específica

(Rang *et al.*, 2003a). De los cinco subtipos de receptores muscarínicos, los M₂ y los M₃ median la mayor parte de las respuestas periféricas, aunque los M₂ se localizan también a nivel central. Mientras que los receptores M₁ son mayoritariamente de tipo post-sináptico y estimulan la liberación de diferentes neurotransmisores, los receptores de tipo M₂, que actúan como autorreceptores, están localizados a nivel pre-sináptico ejerciendo un efecto de retroalimentación negativa sobre la liberación de ACh (Bartolomeo, 2000; Rang *et al.*, 2003a). La distribución del resto de los receptores muscarínicos parece ser más limitada y sus funciones no tan conocidas.

Los receptores M₁ son los más abundantes en el sistema nervioso central y se hallan localizados preferentemente en el neocórtex, hipocampo, sustancia *nigra* y estriado en particular y en áreas cerebrales asociadas con procesos de memoria y cognición en general. Su implicación en los procesos de memoria y cognición ha potenciado la búsqueda de fármacos agonistas con un alto índice de selectividad (Bartolomeo, 2000; Larazeno *et al.*, 2002).

En la EA los receptores M₁ permanecen inalterados mientras que los receptores M₂, sobretodo a nivel de córtex frontal, muestran una significativa reducción en cuanto a número (DeKosky and López, 1998). Sin embargo se ha observado que algunos pacientes con EA, de forma excepcional, muestran una sobreexpresión de los receptores muscarínicos M₂ a nivel del córtex frontal y del córtex temporal (Lai *et al.*, 2001). En estos casos se ha descrito una sintomatología psiquiátrica asociada a la enfermedad. Como consecuencia, la administración de antagonistas muscarínicos M₂ pueden reducir la sintomatología psicótica en estos pacientes (Bodick *et al.*, 1997). En otros casos en que no se observa una sobreexpresión de los receptores M₂, la administración de ciertos fármacos con actividad antimuscarínica, como los que se prescriben en la enfermedad de Parkinson para el control de los temblores, pueden inducir la aparición de signos de demencia en estos enfermos (Perry *et al.*, 2003). Se cree en la posibilidad de que la administración de estos fármacos en pacientes de Parkinson, puede incrementar la deposición de placas seniles (Perry *et al.*, 2003).

Los receptores M₁ se han relacionado con los tres aspectos más relevantes en la fisiopatología de la EA: a) la deposición del péptido β A; b) la hiperfosforilación de la proteína τ y posterior formación de los ovillos neurofibrilares y c) la pérdida de la función cognitiva por alteración colinérgica (Fisher *et al.*, 2003; Login, 1996). Así se ha

demostrado que los agonistas M_1 incrementan la secreción de la PPA debido a la activación de la α -secretasa y a la inhibición de la vía de la γ -secretasa, reduciendo de este modo la formación del β A y mejorando la función cognitiva en modelos animales (Fischer *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2003). Los agonistas M_1 pueden, también, inhibir la actividad neurotóxica de la β A bloqueando la capacidad que tiene dicha proteína para activar enzimas relacionadas con importantes funciones celulares y que pueden inducir la muerte neuronal (Fisher *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2003; Hock *et al.*, 2003).

Existe un nuevo grupo de fármacos alostéricos que se unen a un sitio distinto al de la ACh en el receptor muscarínico, incrementando la afinidad o la eficacia del neurotransmisor por dicho receptor muscarínico (Larazeno *et al.*, 2002). A pesar de ello, la eficacia real de los agonistas muscarínicos M_1 en los pacientes de EA queda por determinar (Messer, 2002).

Sin embargo una alternativa al uso de los agonistas muscarínicos M_1 , es el uso de antagonistas de los receptores M_2 pre-sinápticos que podrían, así mismo, representar una opción terapéutica para el tratamiento de la EA dado que el bloqueo de la actividad de estos autorreceptores da lugar a un incremento en la liberación de ACh. Se ha observado, en estudios *in vivo* (Lachowicz *et al.*, 2001), que el compuesto SCH 72788 induce un incremento en la liberación de ACh en cultivos celulares de células ováricas de hámster (COH) que expresan receptores muscarínicos M_2 humanos.

4.2. Los receptores nicotínicos.

Los receptores nicotínicos (**fig 6**) son de tipo ionotrópico y están formados por diferentes subunidades α , β , δ y γ , siendo la subunidad α la encargada de reconocer al agonista endógeno, la ACh (Rang *et al.*, 2003a). Las diferentes subunidades que forman el receptor y su distribución en el mismo, determinan el subtipo de receptor y con ello sus diferentes características farmacológicas.

A nivel del sistema nervioso central, los receptores nicotínicos se hallan ampliamente distribuidos y aunque se conoce su localización y se han podido caracterizar diferentes tipos de receptores, queda aún por determinar de forma más detallada su

importancia en la neurotransmisión colinérgica y en otros procesos neuronales. Si bien se localizan tanto a nivel presináptico como postsináptico, en todos los casos los receptores nicotínicos favorecen la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico. En la EA se ha observado que el número de receptores nicotínicos se reduce de forma significativa sea cual sea su localización (Benzi and Moretti, 1998).

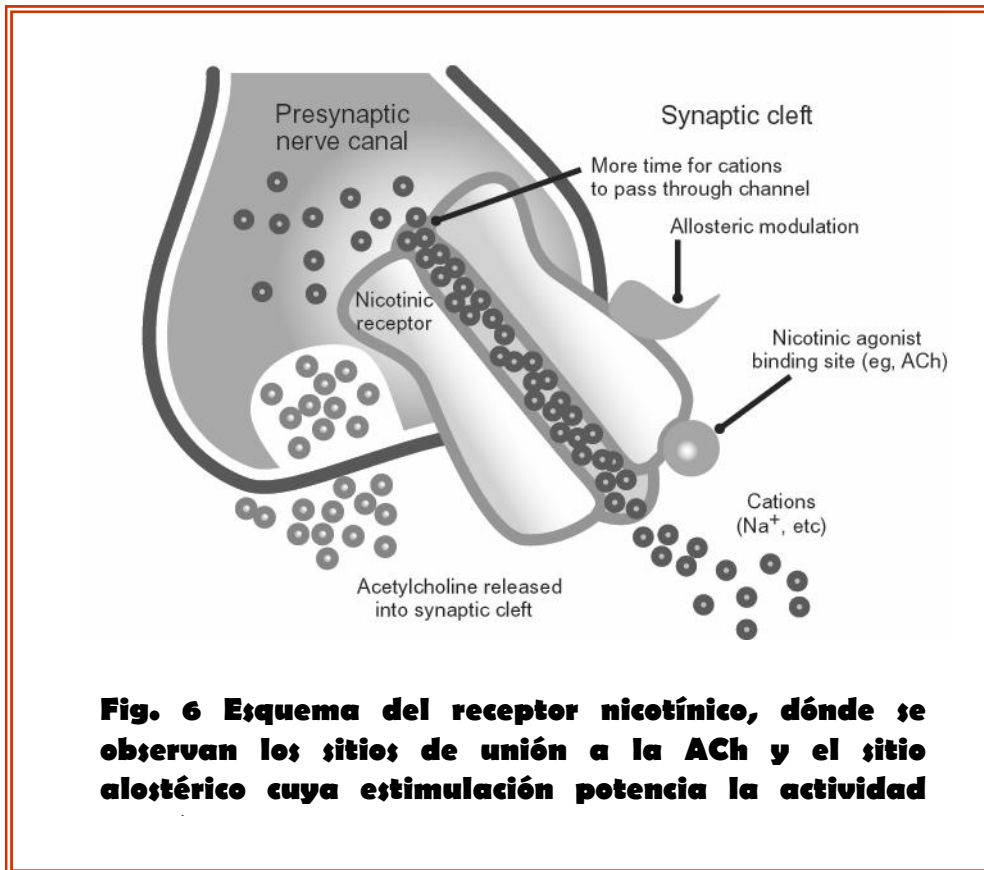


Fig. 6 Esquema del receptor nicotínico, dónde se observan los sitios de unión a la ACh y el sitio alostérico cuya estimulación potencia la actividad

Existen numerosos datos relacionados con los receptores nicotínicos y su papel en desórdenes neurodegenerativos (Martín-Ruiz *et al.*, 1999; Pauly, 1998; Woodruff-Pak and Santos, 2000). Así, en determinaciones *postmortem* (Levin and Rezvani, 2002), se ha establecido de forma clara la disminución de receptores nicotínicos en pacientes con EA, enfermedad de Parkinson y otra clase de demencias. Además, estudios experimentales realizados en cultivos celulares han demostrado la capacidad neuroprotectora de estos receptores, efecto que parece estar mediado por el receptor nicotínico del tipo $\alpha 7$ (O'Neill *et al.*, 2002; Dajas-Bailador *et al.*, 2003; Dani *et al.*, 2004). Varios grupos han observado un efecto neuroprotector inducido por la nicotina, en cultivos primarios de neuronas corticales de cerebelo y estriado (Donnelly-Roberts *et al.*, 1996; Minana *et al.*, 1998); estos efectos neuroprotectores se revirtieron total o parcialmente en presencia de inhibidores de los receptores nicotínicos como la mecamilamina o el hexametonio. La protección inducida por los agonistas nicotínicos es concentración y tiempo dependiente.

Dado la relevante función de estos receptores en los procesos de neuroprotección y en la actividad del sistema colinérgico, se han desarrollado nuevos compuestos con el fin de obtener alternativas terapéuticas para el tratamiento de la EA (la relación entre los receptores nicotínicos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ con los mecanismos de la memoria, está ampliamente demostrada (Hogg and Bertrand, 2004)). En este sentido, el estudio de compuestos alostéricos de los receptores nicotínicos con el fin de potenciar la acción de la ACh sobre dicho receptor, parece ofrecer nuevas posibilidades terapéuticas. Aunque existen diferentes compuestos que han demostrado dar lugar a un efecto alostérico sobre los receptores nicotínicos (Krause *et al.*, 1997; Zwart *et al.*, 1995; Zwart and Vijverberg, 1997) como el nefiracetam (Campos *et al.*, 1998; Narahashi *et al.*, 2003), un nuevo fármaco diseñado para el tratamiento de la EA y otras demencias, los IChE siguen siendo los fármacos de elección en este aspecto, así la galantamina aumenta la eficacia de la respuesta del receptor nicotínico al estímulo de la ACh (Arias *et al.*, 2000; Geerts *et al.*, 2002). Ello se pone de manifiesto con un aumento del número de despolarizaciones inducidas por el agonista endógeno (ACh) y en el número de aperturas del canal de dicho receptor (Dajas-Bailador *et al.*, 2003).

Los tratamientos experimentales basados en la administración de fármacos que potencian la actividad nicotínica, mejoran claramente la disfunción cognitiva observada en la EA. El uso de estos fármacos en otras enfermedades similares, en algunos aspectos a la EA, tales como la esquizofrenia, el déficit atencional y el desorden hiperactivo, también han inducido una mejora en la sintomatología (Levin and Rezvani, 2002).

A todo ello cabe añadir además que la estimulación de los receptores nicotínicos está también relacionada con una disminución de los depósitos de placas seniles en el SNC, bloqueando, de forma indirecta, la acción de la γ -secretasa (Utsuki *et al.*, 2002).

4.3. La acetilcolinesterasa. Fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa.

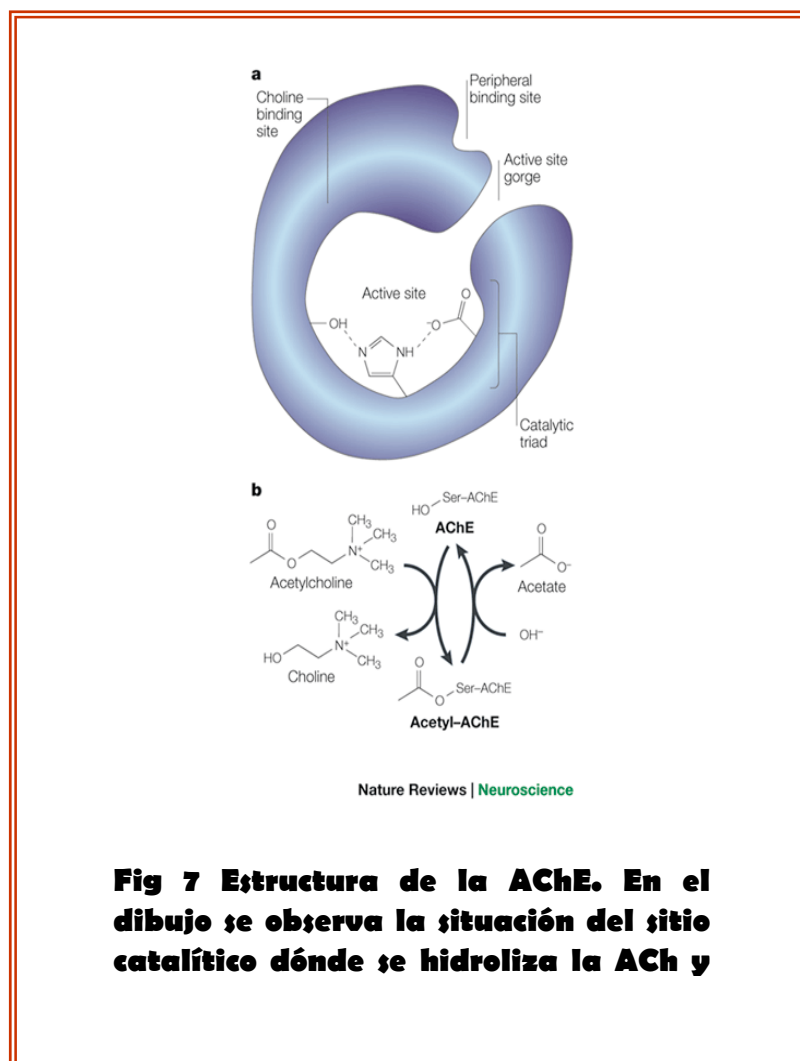
En los vertebrados, existen dos tipos principales de colinesterasas (ChE), la AChE y la butirilcolinesterasa (BuChE). Ambas son similares en su estructura molecular, pero presentan distinta distribución, especificidad de sustrato y función. Ambos tipos constan de subunidades catalíticas globulares que constituyen las formas solubles que se encuentran en el plasma (la BuChE) y en el líquido cefalorraquídeo (la AChE). En otras zonas, las unidades catalíticas de la AChE, están unidas a proteínas de tipo colágeno o glucoproteínas, mediante las cuales se fijan a la membrana celular o a la membrana basal (Rang *et al.*, 2003a).

En las sinapsis colinérgicas, la AChE se puede hallar fijada tanto a la membrana basal de la hendidura sináptica como en forma soluble, y tiene como función hidrolizar la ACh liberada. La forma soluble se halla también presente en el plasma (Tayebati *et al.*, 2002), y la forma fijada a la membrana, en los eritrocitos, donde ejerce una función todavía desconocida ((No authors listed), 2004).

La BuChE tiene una amplia distribución y se encuentra en tejidos como el hígado, cerebro, músculo liso gastrointestinal y en el plasma. Es menos específica en cuanto a sustrato que la AChE y su función no es del todo conocida aunque actualmente se cree que su papel ha sido infravalorado al considerar que su inhibición tan sólo producía efectos colinérgicos periféricos. Recientemente se ha probado que la BuChE tiene además una importante función en la hidrólisis de la ACh en el SNC, lo cual

podría conferir a esta enzima un papel mucho más amplio en la neurotransmisión colinérgica de lo que se pensó inicialmente (Geula and Darvesh, 2004)

Se sabe que el locus activo de la AChE contiene una serina activa que es parte de una triada catalítica, Glu-His-Ser que no es accesible directamente desde la superficie de la proteína sino que está situado a unos 20 Å de profundidad, al final de una larga y estrecha cavidad denominada garganta catalítica (Szegeletes *et al.*, 1998; Szegeletes *et al.*, 1999). Considerando que la AChE es una de las enzimas más rápidas que se conocen (Mendelson *et al.*, 1998), este hecho es sorprendente ya que parecería limitar el paso de sustratos. La AChE y la BuChE difieren en el volumen del sitio catalítico dónde se acomoda el sustrato, siendo más grande en el caso de la BuChE, lo cual explicaría el hecho de que la AChE hidrolice la ACh pero no la butirilcolina (BuCh), mientras que la BuChE puede hidrolizar ambos sustratos así como diversos ésteres más.



La AChE y la BuChE pertenecen al grupo de enzimas de las serina-hidrolasas. El sitio catalítico (**fig 7**) de la AChE tiene dos regiones diferentes: una aniónica que posee un residuo glutamato y otra esterásica con un grupo imidazol de la histidina y uno OH- de la serina. Cuando la hidrólisis tiene lugar, el grupo acetilo de la ACh es transferido a la serina, dejando la enzima acetilada y una molécula libre de colina. La hidrólisis espontánea del grupo acetil-serina se da rápidamente. Los IChE tienen grupos básicos que se fijan al lugar aniónico de la enzima mientras que otros grupos pueden fijarse al sitio esterásico. La AChE hidroliza también a los IChE pero a una velocidad muy lenta en comparación con la velocidad de hidrólisis de la ACh que tiene lugar en milisegundos. La velocidad de hidrólisis de los IChE será del orden de minutos, horas, días o incluso semanas en función del compuesto, siendo esta la base para su clasificación.

Existen inhibidores como el propidio y la toxina fasciculina, que no penetran en el sitio catalítico si no que se unen al sitio periférico localizado en la entrada de la garganta catalítica (**fig 7**). Finalmente, algunos inhibidores se unen simultáneamente al sitio catalítico y al periférico, como por ejemplo el compuesto biscuaternario BW284c51 (Costagli and Galli, 1998). Ambos sitios de la enzima poseen residuos que contribuyen de forma importante a la unión de los ligandos.

Se han descrito numerosas isoformas de la AChE siendo la forma globular tetramérica G4 unida a membrana, la predominante en el cerebro (80%), existiendo además una pequeña cantidad de la forma monomérica G1. En la EA se da una pérdida selectiva de la forma G4 en zonas de la corteza cerebral e hipocampo, induciendo una alteración en la proporción de ambas isoformas dando lugar a un predominio de la forma G1 (Siek *et al.*, 1990).

Parece ser que en el proceso normal de envejecimiento, no existe una disminución significativa en la actividad de la AChE en la corteza cerebral. Sin embargo, en pacientes con EA sí existe una importante disminución en la concentración de AChE, además la proporción AChE/BuChE se ve, así mismo, alterada durante el progreso de la enfermedad. Se ha comprobado la presencia de una correlación positiva entre la pérdida de la actividad de la AChE y la gravedad de la demencia (Ibach and Haen, 2004). En la EA la actividad de la AChE disminuye hasta niveles tan bajos como el

10-15 % de los valores normales, mientras que la BuChE permanece inalterada o incluso incrementa su actividad hasta un 20% (Arendt *et al.*, 1992).

Por otro lado se ha observado que en cerebros humanos y en los de ratones transgénicos modificados (Muñoz and Inestrosa, 1999), la AChE acelera la formación de las placas seniles y este efecto parece estar directamente relacionado con la activación del llamado sitio periférico localizado por encima del sitio activo (Inestrosa and Alvarez, 1996; Muñoz and Inestrosa, 1999). Esta acción no-colinérgica, explica que a la AChE se le haya asociado una potencial citotoxicidad tanto sobre las células gliales como sobre las neuronales. La observación de la condensación cromosómica en presencia de determinadas concentraciones de AChE purificada, y en distintas condiciones, indica que la muerte celular por apoptosis es también resultado de la acción de la AChE. (Calderón *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta que las placas seniles están compuestas principalmente por βA_{1-40} y βA_{1-42} se ha estudiado también cómo este factor puede influir en la actividad proamiloidogénica de la AChE. Parece ser que los agregados formados por βA_{1-42} incrementan su capacidad neurotóxica en presencia de la AChE y la citotoxicidad producida por los agregados de βA_{1-40} depende de la concentración de la AChE unida al complejo, de tal manera que cuanto mayor sea la concentración de la enzima más tóxicos serán los complejos (Muñoz and Inestrosa, 1999).

Dados todos los procesos en los que están implicados los IChE, la eficacia de éstos en el tratamiento de la EA parece no estar únicamente relacionada con su actividad como inhibidores de la enzima AChE (Narahashi *et al.*, 2003), en consecuencia, la función de estos fármacos se analiza actualmente bajo tres aspectos: a) su actividad anticolinesterásica, b) su actividad alostérica sobre los receptores nicotínicos y c) su capacidad para bloquear el locus periférico que interviene en el proceso de agregación de la proteína βA . Así pues, si bien el uso de los IChE en la terapia farmacológica de la EA no detiene el deterioro cognitivo, se ha demostrado que su uso proporciona un notable beneficio en los enfermos de Alzheimer.

4.3.1. Principales anticolinesterásicos usados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Actualmente los IACHe representan la aproximación terapéutica más estudiada y la que ha proporcionado los únicos fármacos admitidos por las agencias de medicamentos para el tratamiento de la EA: la tacrina (Cognex[®]), el donepecilo (Aricept[®]), la rivastigmina (Exelon[®]) y la galantamina (Reminyl[®]) (Alzheimer's Association, 2003). Cabe destacar que entre los distintos IACHe que se encuentran en fase de estudio se halla también la huperzina A, un alcaloide natural que se extrae del licopodio *Huperzia serrata*. La huperzina A ha sido utilizada en la medicina tradicional china durante mucho tiempo debido a sus efectos beneficiosos sobre las funciones cognitivas (Tang *et al.*, 1989).

La **tacrina**, 1,2,3,4-tetrahidro-9-aminocridina, fue el primer fármaco aprobado para el tratamiento de la EA. Se ha demostrado que este compuesto facilita los procesos de memoria en pacientes con EA, sin embargo, se requieren dosis elevadas para su eficacia terapéutica y su pauta de administración es de 4 veces al día. Todo esto junto con el hecho de que la tacrina al inhibir por igual la AChE y la BuChE hace que se presenten importantes efectos indeseables (alteraciones gastrointestinales y hepatotoxicidad), es la causa del uso limitado de este fármaco (Pang *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que la tacrina, además de actuar como IACHe, interacciona con los receptores muscarínicos, presentando una afinidad muy similar por los de tipo M₁ y M₂ (Svensson *et al.*, 1996; Zhao and Tang, 2002). De entre los receptores muscarínicos, el subtipo M₁ tiene un papel especialmente importante en la EA debido a su relación con las alteraciones patológicas más importantes de la enfermedad (Birdsall and Nathanson, 2001; Bodick *et al.*, 1997; Login, 1996). La activación de este receptor por parte de la tacrina (De Boer and Abercrombie, 1996), incrementa la secreción de la PPA vía activación de la α -secretasa, disminuye la formación de la β A mediante la inhibición de la γ -secretasa e inhibe el efecto negativo del estrés oxidativo responsable, también de la muerte celular (Fisher *et al.*, 2003).

Se ha podido observar también que tras la administración de tacrina a pacientes con EA se produce un incremento en la densidad de receptores nicotínicos (Nordberg *et al.*, 1992). A parte de este efecto sobre los receptores nicotínicos algunos autores han demostrado la capacidad de la tacrina para potenciar de forma alostérica el citado receptor (Zwart *et al.*, 2000), sin embargo en este punto existe mucha controversia.

El **donepezilo** es una benzilpiperacina que ha desplazado en su uso a la tacrina. Es, así mismo, un inhibidor reversible de la AChE pero con una acción más selectiva disminuyendo, así, su efecto sobre la BuChE (Ruiz-Nuño *et al.*, 1998). Sus características farmacológicas hacen que presente menos efectos indeseables y su mayor tiempo medio de eliminación hace que sólo sea necesaria una administración al día del fármaco (Arenas and Gou, 1998). Resultados experimentales han demostrado que el donepezilo activa de forma directa los receptores nicotínicos (Zhang *et al.*, 2004) de manera que puede tener interés debido a la relación que la activación de estos receptores tiene con los efectos neuroprotectores y tróficos sobre la población neuronal (De Ferrari *et al.*, 2001).

La **rivastigmina**, pertenece al grupo de los carbamatos los cuales inhiben la AChE uniéndose directamente al sitio activo con una cinética reversible lenta, actuando durante un tiempo aproximado de 10 horas (IChE de acción media). Se ha observado que el modo de acción y el metabolismo de la rivastigmina hacen poco probable las interacciones con otros fármacos, lo cual es de especial interés en pacientes de edad avanzada puesto que suelen recibir tratamientos farmacológicos concomitantes. Los efectos adversos más relevantes tienen lugar a nivel gastrointestinal y desaparecen con administraciones sucesivas del fármaco (Salud, 1999).

La **galantamina** es un alcaloide terciario obtenido actualmente por síntesis, pero originariamente derivado de los bulbos de la campanilla de invierno (*Galanthus nivalis*) y de varias especies de narcisos. Este compuesto es menos potente que los demás IChE mencionados, pero a la vez muestra menos efectos indeseables. La galantamina es una molécula que actúa en el sistema colinérgico a diferentes niveles. Aumenta la disponibilidad sináptica de ACh al inhibir de forma competitiva y reversible la AChE (Bores *et al.*, 1996). Su selectividad por la AChE es 50 veces superior que por la BuChE (Thomsen *et al.*, 1991). La galantamina puede, así mismo, potenciar la respuesta de la ACh (Maelicke *et al.*, 2001; Samochocki *et al.*, 2000), mediante la modulación alostérica del receptor nicotínico, siendo éste un efecto independiente de la inhibición de la AChE (Maelicke *et al.*, 2001). El receptor nicotínico presináptico se hace más sensible a la ACh y se amplifica su respuesta. Los moduladores alostéricos de los receptores nicotínicos, como es el caso de la galantamina, evitan el problema de la

desensibilización de los receptores nicotínicos inducida por los agonistas nicotínicos y, en consecuencia, el desarrollo de la tolerancia y disminución de la eficacia clínica (Samochocki *et al.*, 2000).

La galantamina previene la apoptosis inducida por la taspigargina (un inhibidor irreversible de la bomba ATPasa calcio-dependiente del retículo endoplasmático), mediante un efecto neuroprotector que parece estar asociado a receptores $\alpha 7$ (Arias *et al.*, 2000). El tratamiento crónico de las células con concentraciones neuroprotectoras de galantamina induce una sobreexpresión de receptores $\alpha 7$ y de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

También en relación a su capacidad neuroprotectora, se ha observado que el tratamiento con NGF o con galantamina, previene o mejora el progreso neurodegenerativo secundario al déficit de NGF (Capsoni *et al.*, 2002). Así mismo, en ratas sometidas a isquemia cerebral global con reperusión, se ha descrito que el tratamiento post-isquémico con galantamina permitió la recuperación de la capacidad de aprendizaje respecto a los animales no tratados (Iliev *et al.*, 2000).

Cómo se ha puesto de manifiesto, la galantamina presenta una relevante acción sobre los receptores nicotínicos, pero se ha podido observar que no induce respuesta alguna al interactuar con los receptores muscarínicos (Samochocki *et al.*, 2003). Este efecto se ha observado en cinco líneas celulares cada una de ellas expresando uno de los cinco tipos de receptores muscarínicos (M_1 - M_5), confirmándose que la galantamina no alteraba la actividad de ninguno de ellos (Samochocki *et al.*, 2003).

La **huperzina A**, es una amina de origen natural (Tang and Han, 1999), que se extrae del licopodio *Huperzia serrata*, utilizada en China durante muchos años para el tratamiento de diversas enfermedades. Se trata de un inhibidor reversible, potente y selectivo de la AChE, que se absorbe rápidamente y que penetra con facilidad en el SNC. En comparación con la tacrina o el donepezilo, la huperzina A tiene un tiempo de acción mayor y un mejor índice terapéutico (Tang and Han, 1999). Además, ha demostrado producir una mejora en los procesos cognitivos de pacientes de Alzheimer sin inducir efectos colinérgicos periféricos importantes a dosis terapéuticas. Una de las características más destacables es que este compuesto reduce la muerte neuronal inducida por glutamato (Zangara, 2003) mostrando así, un efecto neuroprotector.

La potenciación a largo plazo o potenciación duradera en el hipocampo, es una forma de plasticidad sináptica prolongada en el tiempo la cual se cree que es un modelo simple de cierta forma de aprendizaje y memoria (Bliss and Collingridge, 1993). Su inducción, en la región hipocámpal CA1, se lleva a cabo a través de vías glutamatérgicas, especialmente a través de los receptores de la NMDA (Collingridge, 1985), aunque también está modulada por la acción de la ACh (Hirotsu *et al.*, 1989) y el GABA (Wingstrom and Gustafsson, 1985). Tras la administración del fragmento A β ₃₁₋₃₅ (fragmento perteneciente al dominio activo de la A β) (Pike *et al.*, 1995) se observa una marcada supresión de la potenciación a largo plazo a nivel de la región CA1 en el hipocampo. Este efecto fue marcadamente revertido gracias a la presencia de la (-)huperzina A, mostrando así una capacidad neuroprotectora frente a la actividad de la A β (Ye and Qiao, 1999).

Además la huperzina A también muestra un efecto neuroprotector frente a la actividad oxidante del peróxido de hidrógeno (Xiao *et al.*, 1999), que la relaciona con la capacidad de prevención del daño oxidativo que se produce en la EA. Se ha observado el efecto neuroprotector de la huperzina A frente a la actividad oxidante de otro fragmento de la A β , el fragmento A β ₂₅₋₃₅ (Xiao *et al.*, 2000). Ello concluye en que la huperzina A muestra un significativo efecto neuroprotector frente a la actividad tóxica que la A β induce sobre las neuronas, muy probablemente a través de una actividad antioxidante.

Se han realizado muy pocos estudios relacionados con la actividad directa de la huperzina A sobre los receptores colinérgicos. Por los resultados obtenidos se puede considerar a la huperzina A como un IACHe puro debido que poco o ningún efecto tiene este fármaco ni sobre los receptores muscarínicos (Alcalá *et al.*, 2003) ni sobre los nicotínicos (Fayuk and Yakel, 2004).

4.3.2. Efectos de los anticolinesterásicos sobre otros sistemas de neurotransmisión.

Aunque la acción principal de los fármacos anticolinesterásicos es la inhibición de la degradación de la ACh, existen otros factores que contribuyen a la eficacia clínica de estos fármacos. Diversas evidencias experimentales y clínicas señalan la existencia de

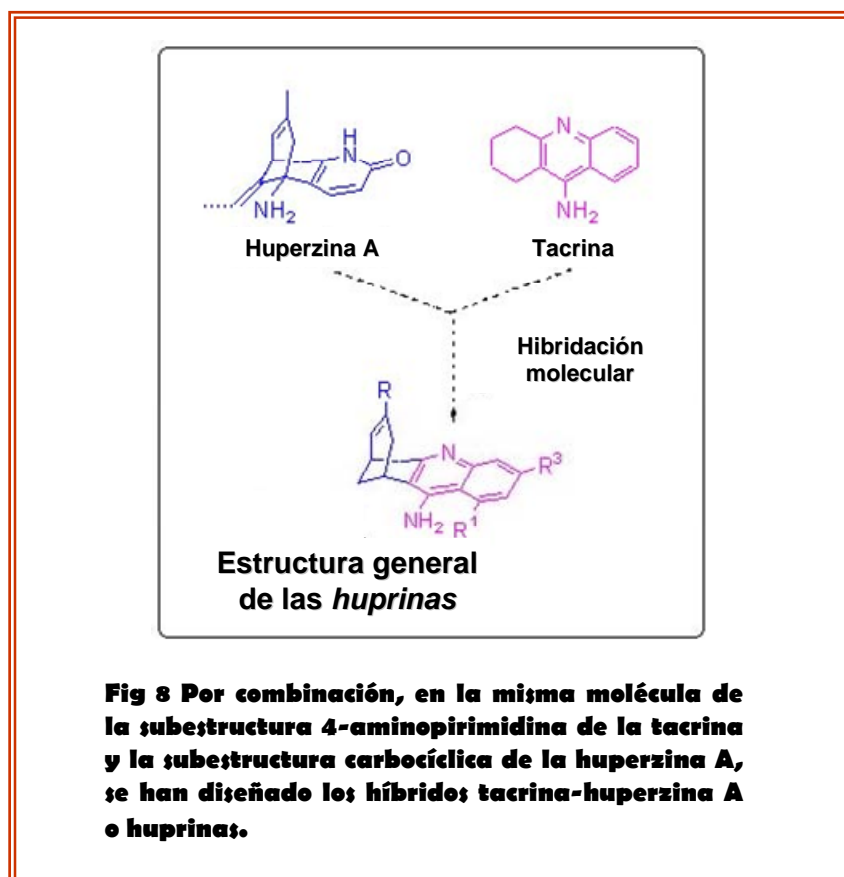
interacciones entre el sistema colinérgico y el sistema de aminas biógenas en la EA (Baud *et al.*, 1985; Ramirez *et al.*, 1997). A nivel experimental se ha observado que los cambios en los niveles extracelulares de la ACh tras la administración de IChE se relacionan con aumentos significativos de noradrenalina y dopamina (Cobo *et al.*, 1993; De Boer and Abercrombie, 1996). Los receptores nicotínicos y muscarínicos no sólo están presentes en las terminaciones colinérgicas, sino que existen también en las terminaciones monoaminérgicas. Este hecho explicaría el aumento de la actividad de estos sistemas de neurotransmisión inducido por la acción de la tacrina (Balddwin *et al.*, 1991) o bien por acción del donepezilo o la galantamina que a través de los receptores nicotínicos incrementan la liberación de la dopamina (Zhang *et al.*, 2004). Esto hace que sean útiles también para el tratamiento de la sintomatología no cognitiva asociada a la EA (Cummings, 2000). Así pues se ha observado como estos compuestos dan lugar a un incremento significativo en los niveles de ACh y en los de noradrenalina, dopamina y serotonina en corteza cerebral tras su administración sistémica.

En la EA, pues, son frecuentes los síntomas no cognitivos que aparecen en un 90% de los casos, siendo la alteración más frecuente la apatía o la indiferencia (70% de los pacientes) (Cummings, 1995; Dubois and Deweer, 1998), además de depresión moderada y profunda y síntomas psicóticos. Distintas consideraciones bioquímicas y farmacológicas sugieren que la deficiencia colinérgica presente en la EA podría ser la responsable en parte de algunos de los síntomas no cognitivos, lo cual viene confirmado por el hecho de que los agentes anticolinérgicos pueden inducir psicosis, mientras que los agentes colinérgicos, como los IChE y agonistas muscarínicos, producen una mejoría de estos síntomas y reducen la agitación de los pacientes (Palmer, 2002).

En consecuencia, el hecho de que algunos anticolinesterásicos presenten acciones directas sobre los receptores colinérgicos podría contribuir a la mejora de la sintomatología no cognitiva en los enfermos de Alzheimer.

5. FÁRMACOS HÍBRIDOS TACRINA-HUPERZINA A. ANTECEDENTES

Desde 1990, la Unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UAB, ha estado colaborando con el Departamento de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, dirigido por el Dr. Pelayo Camps, con el objetivo de diseñar y sintetizar nuevos derivados anticolinesterásicos con un mejor perfil farmacológico para su potencial uso terapéutico en el tratamiento de la EA.



En una primera etapa se analizaron algunos derivados del compuesto original, la tacrina, que mostraban un menor grado de toxicidad aguda (Aguado *et al.*, 1994). En una segunda fase, la estrategia seguida fue el análisis de diversos fármacos obtenidos mediante la hibridación de la tacrina con la huperzina A (**fig 8**), haciendo múltiples sustituciones en diversas partes de la molécula (Badia *et al.*, 1998; Camps *et al.*, 1999; Ros *et al.*, 2001). El resultado fue la obtención de fármacos que inhiben la AChE con elevada potencia, algunos de ellos en rango nanomolar, y con toxicidad aguda relativa inferior a la tacrina. Estos fármacos híbridos tacrina-huperzina A, denominados *huprinas*, son el resultado de la síntesis por farmacomodulación

conjuntiva de la huperzina A (subestructura carbocíclica) y la tacrina (subestructura 4 aminoquinolina), suprimiendo el grupo etildileno de la huperzina A.

El trabajo realizado con estos nuevos compuestos se basa en la hipótesis colinérgica de la EA que es la que ha generado el actual abordaje terapéutico de dicha enfermedad. A partir de estudios previos realizados en nuestro departamento, se ha puesto de manifiesto la potentísima actividad anticolinesterásica de las *huprinas*, superior a la tacrina, la huperzina A y a otros anticolinesterásicos utilizados en la actualidad en el tratamiento de la EA (Alcalá *et al.*, 2003). Mediante técnicas *in vitro* se determinó su capacidad anticolinesterásica, la reversibilidad de la unión con la enzima y se determinó de qué tipo de inhibición se trataba. Así mismo se llevaron a cabo experimentos para determinar su actividad anticolinesterásica *ex vivo*.

Se han llevado a cabo trabajos otros trabajos con las *huprinas* (Camps *et al.*, 2000), en los que se ha estudiado su capacidad para unirse al sitio periférico de la AChE en vistas a definir la actividad antiagregante de la proteína β A de estos compuestos (Camps *et al.*, 2004).

6. OBJETIVOS.

Se han realizado enormes esfuerzos para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EA, estrategias basadas en el uso de fármacos que disminuyan la velocidad de desarrollo de la enfermedad. Los IACHE que reducen el avance de la enfermedad de forma temporal y por ello retrasan el deterioro cognitivo de los enfermos de EA, siguen siendo, hoy por hoy, los únicos fármacos que

están aprobados para el tratamiento de la EA. Sin embargo, el avance en el conocimiento del desarrollo de la enfermedad ha puesto especial atención en el papel de elementos importantes en el deterioro del SNC como por ejemplo el efecto de la proteína β A en la muerte neuronal o la importancia de los receptores nicotínicos en su papel neuroprotector. Es por ello que en la búsqueda de nuevos tratamientos que incrementen y mantengan la mejoría clínica de los pacientes de EA, se le está dando especial protagonismo a aquellos que combinan más de un mecanismo de acción.

Estudios previos han demostrado que la (\pm)huprina X o (\pm) 12-amino-3-cloro-9-etil-6, 7, 10, 11-tetrahidro-7, 11-metenociclooctano[*b*]-quinolina, presenta una potente acción inhibitoria sobre la actividad de la AchE. Sin embargo, y como objetivo principal del presente trabajo, se ha pretendido establecer el perfil colinérgico de la (\pm)huprina X, para observar su interacción con otros elementos del sistema colinérgico de especial interés en la fisiopatología de la EA, como son los receptores muscarínicos, nicotínicos y locus periférico de la AChE (éste último relacionado con el efecto progrogante sobre la proteína β A). El resultado de este estudio nos presentará una molécula activa en distintos niveles del sistema colinérgico y por ello con un potencial terapéutico de gran interés en el tratamiento sintomático de la EA.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

1. El estudio de la interacción de la (\pm) huprina X con los receptores muscarínicos del tipo M₁ y M₂:
 - a) en hipocampo de rata, mediante la técnica de unión de radioligandos, con el fin de determinar la afinidad de la (\pm)huprina X sobre dichos receptores.
 - b) en estriado y corteza prefrontal de rata, mediante la técnica de superfusión de sinaptosomas para establecer el tipo de interacción sobre dichos receptores.

2. El estudio de la interacción de la (\pm)huprina X sobre los receptores nicotínicos de corteza prefrontal de rata mediante la técnica de superfusión de sinaptosomas:
 - a) determinando la interacción directa con los receptores nicotínicos
 - b) determinando la potenciación de los receptores nicotínicos
3. El estudio del efecto de la (\pm) huprina X y de la galantamina (potenciadores de los receptores nicotínicos), sobre la liberación de ACh en cortes de estriado de rata, con el fin de establecer la importancia de la potenciación del receptor nicotínico en un sistema en el cual están presentes otros neurotransmisores y neuromoduladores. Análisis comparativo con la huperzina A (carente del efecto potenciador sobre los receptores nicotínicos).
4. El estudio del efecto de la (\pm)huprina X sobre la actividad proagregante de la AChE en el proceso de la amiloidogénesis. Dicho estudio, de características preliminares, se lleva a cabo con la proteína priónica PrP₁₀₆₋₁₂₆ de características amiloidogénicas parecidas a las de la β A

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. (No authors listed), 2004. Damage to erythrocyte membranes induced by high-intensity ultrasound. *Biofizika* 49, 845-851.
2. Aguado,F., Badia,A., Baños,J.E., Bosch,F., Bozzo,C., Camps,P., Contreras,J., Dierssen,M., Escolano,C., Görbig,D., Muñoz-Torrero,D., Pujol,M., Simón,M., Vázquez,M., Vivas,N.M., 1994. Synthesis and evaluation of tacrine related compounds for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur.J.Med.Chem.* 29, 205-221.
3. Alcalá,MM., Vivas,N.M., Hospital,S., Camps,P., Muñoz-Torrero,D., Badia,A., 2003. Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine-huperzine A hybrids. *Neuropharmacology* 44, 749-755.
4. Alvarez,A., Alarcón,R., Opazo,C., Campos,E.O., Muñoz,F.J., Calderón,F.H., Dajas,F., Gentry,M.K., Doctor,B.P., De Mello,F.G., Inestrosa,N.C., 1998. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid-b peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J.Neurosc.* 18, 3213-3223.
5. Alzheimer's Association, 2003. About FDA-approved cholinesterase inhibitors. Alzheimer's Association.

6. Ames,B.N., Shigenaga,M.K., 1992. Oxidants are a major contribution to aging. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 663, 85-96.
7. Arenas i Gou,M.T., 1998. Donepezil. *Circ.Farm.* 56, 24-26.
8. Arendt,T., Brükner,M., Lange,M., Bigl,V., 1992. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer´s disease resemble embryonic development. A study of molecular forms. *Neurochem.Inter.* 21, 396.
9. Arias,E., Orozco,C., López,M.G., 2000. Receptores nicotínicos, neuroprotección y galantamina. In: *Fronteras en la enfermedad de Alzheimer.* pp. 167-185.
10. Armstrong,R.A., Lantos,P.L., Cairns,N.J., 2001. The spatial patterns of prion protein deposits in Creutzfeldt-Jakob disease: comparison with b-amyloid deposits in Alzheimer´s disease. *Neurosci.Lett.* 298, 53-56.
11. Auld,D.S., Kar,S., Qurion,R., 1998. Beta- amiloid peptides as a direct cholinergic neuromodulators: a missing link?. *Trends Neurosci.* 21, 43-49.
12. Auld,D.S., Kornecook,T.J., Bastianetto,S., Quirion,R., 2002. Alzheimer´s disease and the basal forebrain cholinergic system: realtions to beta-amyloid peptides, cognition and treatment strategies. *Prog.Neurobiol.* 68, 209-245.
13. Badia,A., Baños,J.E., Camps,P., 1998. Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer´s disease. *Bioorg.Med.Chem* 6, 427-440.
14. Balddwin,H.A., De Souza,R.J., Sarna,G.S., Murray,T.K., Green,A.R., Cross,A.J., 1991. Measurements of tacrine and monoamines in brain by *in vivo* microdialysis argue against release of monoamines by tacrine at therapeutic doses. *Br.J.Pharmacol.* 103, 1946-1950.
15. Bard,F., Cannon,C., Barbour,R., 2000. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer´s disease. *Nat.Med.* 6, 916-919.
16. Bartolomeo,A.C., 2000. The pre-clinical pharmacological profile of WAY-132983 a potent M1 pre-ferring agonist. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 292, 584-596.
17. Baud,P., Arbilla,S., Langer,S.Z., 1985. Inhibition of the electrically evoked release of [³H]acetylcholine in rat striatal slices: an esperimental model for drugs that enhance dopaminergic neurotransmission. *J.Neurochem.* 44, 331-337.
18. Bennecib,M., Gong,C.X., Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., 2001. Inhibition of PP 2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorilation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett.* 490, 15-22.
19. Benzi,G., Moretti,A., 1998. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer´s disease? *Eur.J.Pharmacol.* 346, 1-13.
20. Berkeley,S., 2003. Alzheimer´s disease and alternative therapies. *Neurochem.* 165, 465-467.

21. Birdsall,N.J.M., Nathanson,N.M., 2001. Muscarinic receptors: it's a knockout. *Trends in Pharm Sci.* 22, 215-219.
22. Bliss,T.V.P., Collindrige,G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
23. Bodick,N.C., Offen,W.W., Shannon,H.E., Satterwhite,J., Lucas,R., van Lier,R., Paul,S.M., 1997. The selective muscarinic agonist xanomeline improves both the cognitive deficits and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis.Assoc.Disord.* 11, s16-s22.
24. Bores,G.M., Huger,F.P., Petko,W., Mutlib,A.E., Camacho,F., Rush,D.K., Selk,D.E., Wolf,V., Kosley,R.W.Jr., Davis,I., Vargas,H.M., 1996. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J.Pharm.Exp.Ther.* 277, 728-738.
25. Boyd-Kimball,D., Sultana,R., Mohmmad-Abdul,H., Butterfield,D.A., 2004. Rodent Abeta(1-42) exhibits oxidative stress propierties similars those of human Abeta(1-42): implicatins for proposed mechanisms of toxicity. *J.Alzheimers Dis.* 6, 515-525.
26. Bramblett,G.T., Gedert,M., Jakes,R., Merrick,S.E., Trjanwski,J.Q., Lee,V.M.Y., 1993. Abnormal tau phsophrilation at Ser³⁹⁶ in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduce microtubule binding. *Neuron* 10, 1089-1099.
27. Broytman,O., Malter,JS., 2004. Anti Ab: the good, the bad, the unforeseen. *J.Neurosc.Res.* 75, 301-306.
28. Buhot,M.C., Martin,S., Segu,L., 2000. Role of serotonin in memory impairment. *Ann.Med.* 32, 210-221.
29. Calderón,F.H., von Bernhardt,R., De Ferrari,G.V., Luza,S., Aldunate,R., Inestrosa,N.C., 1998. Toxic effects of acetylcholinesterase on neuronal and glial-like cells in vitro. *Mol.Psychiatry* 3, 247-255.
30. Campion,D., Brice,A., 1998. Familias y genes. *Mundo científico.* 186, 60-62.
31. Campos,E.O., Alvarez,A., Inestrosa,N.C., 1998. Brain acetylcholinesterase promotes amyloid-beta-peptide aggregation but does not hydrolyze amyloid precursor protein peptides. *Neurochem.Res.* 23, 135-140.
32. Camps,P., Cusack,B., Mallender,W.D., El Achab,R., Morral,J., Muñoz-Torrero,D., Rosenberry,T.L., 2000. Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease. *Mol.Pharmacol.* 57, 409-417.
33. Camps,P., El Achab,R., Görbig,D.M., Morral,J., Muñoz-Torrero,D., Badia,A., Baños,J.E., Vivas,N.M., Barril,X., Orozco,M., Luque,F.J., 1999. Synthesis in vitro pharmacology, and molecular modeling of very potent tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *J.Med.Chem* 42, 3227-3242.

34. Camps,P., Formosa,X., Muñoz-Torrero,D., Petriguet,J., Badia,A., Clos,M.V., 2004. Synthesis and pharmacological evaluation of huprine-tacrine heterodimers as subnanomolar dual binding site acetylcholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* 48(6), 1701-1704.
35. Capsoni,S., Giannotta,S., Cattaneo,A., 2002. Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 99, 12432-12437.
36. Chao,Ch.C., Hu,S., 1998. Beta-amyloid protein-induced microglial cell activation. *Alzheimer's Dis. Rev.* 3, 87-90.
37. Cobo,M., Expósito,I., Mora,F., 1993. Aging, prefrontal cortex and amino acid neurotransmitters: differential effects produced by electrical stimulation. *Neurobiol. Aging* 14, 187-190.
38. Collindrige,G.L., 1985. Long term potentiation in the hippocampus: mechanism of initiation and modulation by neurotransmitters. *Trends Pharm Sci.* 10, 407-411.
39. Corey-Bloom,J., 2002. The ABC of Alzheimer's disease: cognitive changes and their management in Alzheimer's disease and related dementias. *Int.Psychogeriatr.* 14, 51-75.
40. Costagli,C., Galli,A., 1998. Inhibition of cholinesterase-associated aryl acylamidase activity by anticholinesterase agents: focus on drugs potentially effective in Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 55 (10), 1733-7.
41. Court,J., Martín-Ruiz,C., Piggot,M., Spurden,D., Griffiths,M., Perry,E., 2001. Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease. *Soc. Biol.Psichiatry* 49, 175-184.
42. Cummings,J.L., 1995. Dementia: the failing brain. *The Lancet* 345, 1481-1484.
43. Cummings,J.L., 2000. Cholinesterase inhibitors: a new class of psychotropic compounds. *Am.J.Psychiatry* 157, 4-15.
44. Curtis,L., Buisson,B., Bertrand,S., Bertrand,D., 2002. Potentiation of human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Mol.Pharmacol.* 61, 127-135.
45. Cyr,M., Calon,F., Morissette,M., Grandbois,M., Di Paolo,T., Callier,S., 2000. Drugs with estrogen-like potency and brain activity: potential therapeutic application for the CNS. *Curr.Pharm.Des.* 6, 1287-1312.
46. Dajas-Bailador,F.A., Heimala,K., Wonnacott,S., 2003. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine is translated into cellular responses in neurons: Ca^{2+} signals and neurotransmitter release. *Mol.Pharmacol.* 64, 1217-1226.
47. Dani,J.A., 2001. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol.Psychiatry* 49, 166-174.
48. Dani,J.A., De Biasi,M., Liang,Y., Peterson,J., Zhang,L., Zhang,T., Zhou,F.M., 2004. Potential applications of nicotinic ligands in the laboratory and clinic. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 14, 1837-1839.

49. De Boer,P., Abercrombie,E.D., 1996. Physiological release of striatal acetylcholine *in vivo*: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *J.Pharm.Exp.Ther.* 277, 775-783.
50. De Ferrari,G.V., Canales,M.A., Shin,I., Weiner,L.M., Silman,I., Inestrosa,N.C., 2001. A structural motif acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* 40, 10447-10457.
51. DeKosky,S.T., López,O.L., 1998. Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Neurol.* 27, s 16-s 24.
52. Donnelly-Roberts,D.L., Xue,I.C., Arneric,S.P., Sullivan,J.P., 1996. In vitro neuroprotective properties of the novel cholinergic channel activator (ChCA), ABT-418. *Brain Res.* 719, 36-44.
53. Dringenberg,H.C., 2000. Alzheimer´s disease. more than a "cholinergic disorder"-evidence that cholinergic-monoaminergic interactions contribute to EEG slowing and dementia. *Behav.Brain.Res.* 115, 235-249.
54. Dubois,B., Deweer,B., 1998. Los extravíos de la memoria. *Mundo científico.* 186, 50-55.
55. Dudal,S., Morissette,C., Lacombe,D., Tremblay,P., Gervais,F., 2004. Differences in the amyloid beta induced inflammatory response microglia from C57BL/6 and A/J strains of mice. *J.Neuroimmunol.* 153, 26-35.
56. Eriksen,J.L., Sagi,S.A., Smith,T.E., Weggen,S., Das,P., McLendon,D.C., Ozols,V.V., Jessing,K.W., Zavitz,K.H., Koo,E.H., Golde,T.E., 2003. NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *J.Clin.Invest.* 112, 440-449.
57. Esch,F.S., Keim,P.S., Beattie,E.C., Blancher,R.W., Culwell,A.R., Oltersdorf,T., McClure,D., Ward,P.J., 1990. Cleavage of amyloid b peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1122-1125.
58. Fayuk,D., Yakel,J.L., 2004. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor channel function by acetylcholinesterase inhibitors in rat hippocampal CA1 interneurons. *Mol.Pharmacol.* 66, 658-666.
59. Fernando,M.S., Ince,P.G., 2004. Vascular pathologies and cognition in a population-based cohort elderly people. *J.Neurol.Sci.* 226, 13-17.
60. Ferrer,I., Boada Rovira,M., Sánchez Guerra,M.L., Rey,M.J., 2004. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer´s disease. *Brain Pathol.* 14, 11-20.
61. Fischer,A., Michaelson,D.M., Brandeis,R., Haring,R., Chapman,S., Pittel,Z., 2000. M1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents in Alzheimer´s disease. Rationale and perspectives.. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 920, 315-320.
62. Fisher,A., Pittel,Z., Haring,R., Bar-Ner,N., Kliger-Spatz,M., Natan,N., Egozi,I., Sonogo,H., Marcovitch,I., Brandeis,R., 2003. M1 muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer´s disease: implications in future therapy. *J.Mol.Neurosci.* 20, 349-356.

63. Francis,P.T., Cross,A.J., Bowen D.M., 1994. Neurotransmitters and neuropeptides. In: Terry,R.D., Katzman,R., Bick,K.L. (Eds.), Alzheimer's disease. Raven Press, New York, pp. 247-261.
64. Garcia-Alloza,M., Hirst,W.D., Chen,C.P., Lasheras,B., Francis,P.T., Ramirez,M.J., 2004. Differential involvement of 5-HT (1B/1D) and 5-HT6 receptors in cognitive and non-cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 29, 410-416.
65. García-Menéndez,S., Padrón,N., Libre,J.J., 2002. Péptido beta amiloide, proteína tau y enfermedad de Alzheimer. *Rev.Cubana Invest.Biomed.* 21, 253-261.
66. García,A.F., Barreiro Tella,P., Díez Tejedor,E., 1998. Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer. *Farmacoterapia XV*; nº 5, 231-239.
67. Geerts,H., Finkel,L., Carr,R., Spiros,A., 2002. Nicotinic receptor modulation: advantages for successful Alzheimer's disease therapy. *J.Neural.Transm.Suppl.* 62, 203-216.
68. Geula,C., Darvesh,S., 2004. Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. *Drugs Today (Barc.)* 40, 711-721.
69. Giacobini,E., Becker,R., 2004. Second and third generation cholinesterase inhibitors: from preclinical studies to clinical efficacy in Alzheimer's disease: therapeutic strategies. In: Giacobini,E., Becker,R. (Eds.), Birkhäuser, Boston, pp. 155-171.
70. Giacobini,E., 1998. Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapy. *J.Physiol.Paris* 92, 283-287.
71. Gong,C.X., Lidsky,T., Wegiel,J., Zuck,L., Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., 2000. Phosphorylation of microtubule phosphorylated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J.Biol.Chem.* 275, 5535-5544.
72. Gong,C.X., Shajkh,T.J., Wang,J.Z., Zaidi,T., Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., 1995. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer's disease. *Neurochem.* 65, 732-738.
73. Gong,C.X., Singh,T.J., Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., 1993. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer's disease brain. *Neurochem.* 61, 921-927.
74. Grossman,H., 2003. Does diabetes protect or provoke Alzheimer's disease? Insights the pathobiology and future treatment of Alzheimer's disease. *CNS Spectr.* 8, 815-823.
75. Gu,Z., Zhong,P., Yan,Z., 2003. Activation of muscarinic receptors inhibits b-amyloid peptide-induced signaling in cortical slices. *J.Biol.Chem.* 278, 17546-17556.
76. Helmuth,L., 2000. Further progress on a beta-amyloid vaccine. *Science* 289, 375.
77. Hirotsu,I., Hon,N., Katsuda,N., Ishihara,T., 1989. Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 482, 194-197.

78. Hock,C., Maddalena,A., Raschig,A., Muller-Spahn,F., Eschweiler,G., Hager,K., Heuser,I., Hampel,H., Muller-Thomson,T., Oertel,W., Wienrich,M., Signorell,A., Gonzalez-Agosti,C., Nitsch,R.M., 2003. Treatment with the selective muscarinic M1 agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of A beta 42 in patients with Alzheimer´s disease. *Amyloid* 10, 1-6.
79. Hogg,R.C., Bertrand,D., 2004. Nicotinic acetylcholine receptors as drug targets. *Curr.Drug Target CNS Neurol.Disord.* 3, 123-130.
80. Hooper,N.M., Turner,A.J., 2002. The search for alpha-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer´s disease. *Curr.Med.Chem.* 9, 1107-1119.
81. Hsiung,G.Y., Sadovnick,A.D., Feldman,H., 2004. Apolipoprotein E epsilon 4 genotype as a risk factor for cognition decline and dementia: data from the Canadian Study of Health Aging. *CMAJ* 171, 863-867.
82. Ibach,B., Haen,E., 2004. Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer´s disease. *Curr.Pharm.Des.* 10, 231-251.
83. Iliev,A.L., Traykov,V.B., Mantchev,G.T., Stoykov,I., Prodanov,D., Yakimova,K.S., Krushkov,I.M., 2000. A post-ischaemic single administration of galanthamine, a cholinesterase inhibitor, improves learning ability in rats. *J.Pharm.Pharmacol.* 52, 1151-1156.
84. Inestrosa,N.C., Alvarez,A., 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer´s fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron.* 16, 881-891.
85. Ishiguro,K., Takamatsu,M., Tomizawa,K., Omori,A., Takahashi,M., Arioka,M., Uchida,T., Imahori,K., 1991. Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J.Biol.Chem.* 267, 10897-10901.
86. Johnson,G.V.W., Hartigan,J., 1998. TAU protein in normal and Alzheimer´s disease brain: an update. *Alzheimer´s Dis. Rev.* 3, 125-141.
87. Jones,R.W., 2003. Have cholinergic therapies reached their clinical boundary in Alzheimer´s disease. *Int.J.Geriatr.Psychiatry.* 18, s7-s13.
88. Kar,S., Seto,D., Gaudreau,P., Quirion,R., 1996. b-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J.Neurosc.* 16, 1034-1040.
89. Kim,H.S., Park,C.H., Cha,S.H., Lee,J.H., Lee,S., Kim,Y., Rah,J.C., Jeong,S., 2000. Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer´s APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J.* 14, 1508-1517.
90. Krause,R.M., Buisson,B., Bertrand,S., Corringer,P.J., Galzi,J.L., Changeux,J.P., Bertrand,D., 1997. Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol.Pharmacol.* 53, 283-294.
91. Lachowicz,J.E., Duffy,R.A., Ruperto,V., Kozlowski,J., Zhou,G., Clader,J., Billard,W., Binch,H.3., Crosby,G., Cohen-Williams,M., Strader,C.D., Coffin,V., 2001.

Facilitation of acetylcholine release and improvement in cognition by a selective M2 muscarinic antagonist, SCH 72788. *Life Sci.* 68, 2585-2592.

92. Lai,M.K., Lai,O.F., Keene,J., Esiri,M.M., Francis,P.T., Hope,T., Chen,C.P., 2001. Psychosis of Alzheimer's disease is associated with elevated muscarinic M2 binding in the cortex. *Neurology* 57, 805-811.
93. Lanctot,K.L., Herrmann,N., Mazzotta,P., 2001. Role of serotonin in the behavioral and psychological symptoms of dementia. *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.* 13, 5-21.
94. Lane,R.M., Kivipelto,M., Greig,N.H., 2004. Acetylcholinesterase and its inhibition in Alzheimer disease. *Clin.Neuropharm.* 27, 141-149.
95. Larazeno,S., Popham,A., Bridsall,N.J., 2002. Towards a high-affinity allosteric enhancer at muscarinic M1 receptors. *J.Mol.Neurosci.* 19, 123-127.
96. Levin,E.D., Rezvani,A.H., 2002. Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. *Curr.Drug Target CNS Neurol.Disord.* 1, 423-431.
97. Li,L., Sengupta,A., Haque,N., Grundke-Iqbal,I., Iqbal,K., 2004. Memantine inhibits and reverses the Alzheimer type abnormal hyperphosphorylation of tau and associated neurodegeneration. *FEBS Lett.* 566, 261-269.
98. Lim,G., Yang,F., Chu,T., Chen,P., Beech,W., Teter,B., Tran,T., Ubeda,O., Ashe,K., Frautsch,S., Cole,G., 2000. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in mouse model for Alzheimer's disease. *J.Neurosci.* 20, 5709-5714.
99. Liu,Q., Zhao,B., 2004. Nicotine attenuates beta-amyloid peptide-induced neurotoxicity radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *Br.J.Pharmacol.* 141, 746-754.
100. Login,J.S., 1996. D2 dopamine receptor activation inhibits basal and forskolin-evoked acetylcholine release from dissociated striatal cholinergic interneurons. *Brain Res.* 749, 147-151.
101. Lopez,O.L., Kaufer,D., Reiter,C.T., 1996. Relationship between CSF neurotransmitter metabolites and aggressive behavior in Alzheimer's disease. *Eur.J.Neurol.* 3, 153-155.
102. Maelicke,A., Samochocki,M., Albuquerque,E.X., 2001. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol.Psychiatry* 1, 279-288.
103. Mann,D.M., Lincoln,J., Yates,P.O., Stamp,J.E., Toper,S., 1980. Changes in the monoamine containing neurons of the human CNS in senile dementia. *Br.J.Psychiatry* 136, 533-541.
104. Martín-Ruiz,C.M., Court,J.A., Molnar,E., Lee,M., 1999. $\alpha 4$ but not $\alpha 3$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J.Neurochem.* 73, 1635-1640.

105. Matthews,K.L., Chen,C.P., Esiri,M.M., Keene,J., Minger,S.L., Francis,P.T., 2002. Noradrenergic changes, aggressive behavior and cognition in patients with dementia. *Biol.Psychiatry* 51, 407-416.
106. Meguro,K., Meister,A., Tanaka,Y., Akanuma,K., Yamaguchi,K., Itoh,M., 2004. Risperidone is effective for wandering and disturbed sleep/wake patterns in Alzheimer´s disease. *J.Geriatr.Psychiatry Neurol.* 17, 61-67.
107. Mendelson,I., Kronman,C., Ariel,N., Shafferman,A., Velan,B., 1998. Bovine acetylcholinesterase: cloning, expression and characterization. *Biochem.J.* 334, 251-259.
108. Messer,W.S.J., 2002. Cholinergic agonists and the treatment of Alzheimer´s disease. *Curr.Top.Med.Chem.* 2, 353-358.
109. Meyer-Luehmann,M., Stadler,M., Herzig,M.C., Kaeser,S.A., Kohler,E., Pfeifer,M., Boncristiano,S., Mathews,P.M., Mercken,M., Abramowski,D., Staufenbiel,M., Jucker,M., 2003. Extracellular amyloid formation and associated pathology in neuronal grafts. *Nature* 6, 370-377.
110. Michaelis,M., 2003. Drugs targeting Alzheimer´s disease: some things old and some things new.. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 304, 897-904.
111. Minana,M.D., Montoliu,C., Llansola,M., Grisolia,S., Felipo,V., 1998. Nicotine prevents glutamate-induced proteolysis of the microtubule-associated protein MAP-2 and glutamate neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *Neuropharmacology* 37, 847-857.
112. Minger,S.L., Esiri,M.M., McDonald,B., Keene,J., Carter,J., Hope,T., Francis,P.T., 2000. Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbances in patients with dementia. *Neurology* 55, 1460-1467.
113. Miranda,S., Opazo,C., Larrondo,L.F., 2000. The role of oxidative stress in the toxicity induced by beta amyloid-peptide in Alzheimer´s disease. *Progress in Neurobiology* 62, 633-648.
114. Monsonegro,A., Weiner,Hl., 2003. Immunotherapeutic approaches to Alzheimer´s disease. *Science* 302, 834-838.
115. Morgan,D., Diamond,D.M., Gottschall,P.E., Ugen,K.E., Dickey,C., Hardy,J., Duff,K., Jantzen,P., DiCarlo,G., Wilcock,D., Connor,K., Hatcher,J., Hope,C., Gordon,M., Arendash,G.W., 2000. A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer´s disease. *Nature* 408, 982-983.
116. Mori,F., Lai,C.C., Fusi,F., Giacobini,E., 1995. Cholinesterase inhibitors increase secretion of APP in rat brain cortex. *NeuroReport* 6, 663-636.
117. Muñoz,F.J., Inestrosa,N.C., 1999. Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid b-peptide aggregates is dependent on the type of Ab peptide and the AChE concentration present in the complexes. *FEBS Lett.* 450, 205-209.
118. Muramoto,T., Kitamoto,T., Koga,H., Tateishi,J., 1992. The coexistence of Alzheimer´s disease and Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with dementia of long duration. *Acta Neuropathol.(Berl)* 84, 686-689.

119. Narahashi,T., Marszalec,W., Moriguchi,S., Yeh,J.Z., Zhao,X., 2003. Unique mechanism of action of Alzheimer's drugs on brain nicotinic acetylcholine receptors and NMDA receptors. *Life Sci.* 74, 281-291.
120. Nicoll,J.A.R., Wilkinson,D., Holmes,C., Steart,P., Markham,H., Weller,R.O., 2003. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: a case report. *Nature Medicine* 9, 448-452.
121. Nordberg,A., Lilja,A., Lundqvist,H., Hartvig,P., Amberla,K., Viitanen,M., Warpman,U., Johansson,M., Hellström-Lindahl,E., Bjurling,P., 1992. Tacrine restores cholinergic nicotinic receptors and glucose metabolism in Alzheimer patients as visualized by positron emission tomography. *Neurobiol. Aging* 13, 747-758.
122. O'Neil,M.J., Murray,T.K., Lakics,V., Visanji,N.P., Duty,S., 2002. The role of neural nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. *Curr. Drug Target CNS Neurol. Disord.* 1, 399-411.
123. Palmer,A.M., 1996. Neurochemical studies of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 5, 381-391.
124. Palmer,A.M., 2002. Pharmacotherapy for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends in Pharm Sci.* 23, 426-433.
125. Pang,Y.P., Quiram,P., Jelacic,T., 1996. Highly potent, selective and low cost bis tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. *J.Biol.Chem.* 271, 23646-23649.
126. Parker,W.D., Davis,R.E., 1998. La hipótesis de las mitocondrias. *Mundo científico.* 188, 62-63.
127. Pauly,J.R., 1998. Nicotinic cholinergic receptor deficits in Alzheimer's disease: where is the smoke? *Alzheimer's Dis. Rev.* 3, 28-34.
128. Perry,E.K., Kilford,L., Lees,A.J., Burn,D.J., Perry,R.H., 2003. Increased Alzheimer pathology in Parkinson's disease related to antimuscarinic drugs. *Ann.Neurol.* 54, 235-238.
129. Pike,C.J., Walencewicz,A.J., Kosmoski,J., Cribbs,D.H., Glabe,C.G., Cotman,C.W., 1995. Structure-activity analyses of β -amyloid peptides: contribution to the b25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J.Neurochem.* 64, 253-265.
130. Planel,E., Yasatuke,K., Fujita,S.C., Ishiguro,K., 2001. Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation the hippocampus of starved mouse. *J.Biol.Chem.* 276, 34298-34306.
131. Qin,W., Ho,L., Pmpri,P.N., Peng,Y., Zhao,Z., Xiang,Z., Robakis,N.K., Shioi,J., Suh,J., Pasinetti,G.M., 2003. Cyclooxygenase (COX)-2 and COX-1 potentiate beta-amyloid peptide generation through mechanisms that involve gamma-secretase activity. *J.Biol.Chem.* 278, 50970-50977.

132. Qiu,Y., Wu,X.J., Chen,H.Z., 2003. Simultaneous changes in secretory amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide release from rat hippocampus by activation of muscarinic receptors. *Neurosci.Lett.* 352, 41-44.
133. Rachakonda,V., Pan,T.H., Le,W.D., 2004. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they?. *Cell Res.* 14, 347-358.
134. Ramirez,M.J., Cenarruzabeitia,E., Lasheras,B., Del Rio,J., 1997. 5-HT₂ receptor regulation of acetylcholine release, induced by dopaminergic stimulation in rat striatal slices. *Brain Res.* 757, 17-23.
135. Rang,H.P., Dale,M.M., Ritter,J.M., Moore,P.K., 2003a. Cholinergic transmission. In: *Pharmacology.* Churchill Livingstone, pp. 136-160.
136. Rang,H.P., Dale,M.M., Ritter,J.M., Moore,P.K., 2003b. Neurodegenerative disorders. In: Churchill Livingstone (Ed.), *Pharmacology.* pp. 490-502.
137. Regland,B., 1993. Alzheimer's disease and senile dementia: biochemical characteristics. In: M.Nicotini, P.F.Zatta, B.Corain (Eds.), *Alzheimer's disease and related disorders, advances in the biosciences.* Vol 87. Pergamon Press, Oxford, pp. 441-444.
138. Ros,E., Aleu,J., Gómez de Aranda,I., Muñoz-Torrero,D., Camps,P., Badia,A., Marsal,J., Solsona,C., 2001. The pharmacology of novel acetylcholinesterase inhibitors (\pm) huprines γ and X on the *Torpedo* electric organ. *Eur.J.Pharmacol.* 421, 77-84.
139. Roses,A.D., 2004. Alzheimer's disease: the genetics of risks. *Mol.Gen.Clin.Pract.*
140. Ruiz-Nuño,A., Pintado,A.J., Novalbos,J.M., 1998. Donepezilo, una alternativa terapéutica en la enfermedad de Alzheimer. *Farmacoterapia XV*, 101-104.
141. Salud, 1999. Actualización del tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer. *Bol.Ter.Andal.* 15, 13-15.
142. Samochocki,M., Höffle,A., Fehrenbacher,A., Jostock,R., Ludwig,J., Christner,C., Radina,M., Zerlin,M., Ullmer,C., Pereira,E.F., Lubbert,H., Albuquerque,E.X., Maelicke,A., 2003. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 305, 1024-1036.
143. Samochocki,M., Zerlin,M., Albuquerque,E.X., 2000. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of the human α 4/ β 2 nAChR. *Acta Neural Scand.Suppl.* 176, 68-73.
144. Sano,M., Ernesto,C., Thomas,R., Inoué,K., Machida,H., Knapp,R.G., et al., 1997. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol or both as treatment of Alzheimer's disease. The Alzheimer's disease cooperative study. *N.Engl.J.Med.* 336, 1216-1222.
145. Schöder,H., Wevers,A., 1998. Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dis. Rev.* 3, 20-27.

146. Segura,T., Galindo,M.F., Rallo-Gutiérrez,B., Ceña,V., Jordán,J., 2003. Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev.Neurol.* 36, 1047-1057.
147. Siek,G., Katz,L., Fishman,E., Korosi,T., Marquis,J., 1990. Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer's disease brain. *Biol.Psychiatry* 27, 573-580.
148. Storga,D., Vrecko,K., Birkmayer,J.G.D., Reibnegger,G., 1996. Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neurosci.Lett.* 203, 29-32.
149. Svensson,A.L., 2000. Tacrine interacts with different sites on nicotinic receptor subtypes in SH-SY5Y neuroblastoma and M10 cells. *Behav.Brain.Res.* 113, 193-197.
150. Svensson,A.L., Warpman,U., Hellström-Lindahl,E., Bogdanovic,N., Lannfelt,L., Nordberg,A., 1997. Nicotinic receptors, muscarinic receptors and choline acetyltransferase activity in the temporal cortex of Alzheimer patients with differing apolipoprotein E genotypes. *Neurosci.Lett.* 232, 37-40.
151. Svensson,A.L., Zhang,X., Nordberg,A., 1996. Biphasic effect of tacrine on acetylcholine release in rat brain M₁ and M₂ receptors. *Brain Res.* 726, 207-212.
152. Szegletes,T., Mallender,W.D., Rosenberry,T.L., 1998. Nonequilibrium analysis alters the mechanistic interpretation of inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands. *Biochemistry* 37, 4216.
153. Szegletes,T., Mallender,W.D., Thomas,P.J., Rosenberry,T.L., 1999. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* 38, 122-133.
154. Tabet,N., Feldman,H., 2003. Ibuprofen for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst.Rev.* 2.
155. Tan,R.S., Pu,S.J., 2003. A pilot study on the effects of testosterone in hypogonadal aging male patients with Alzheimer's disease. *Aging Male* 6, 13-17.
156. Tanaka,Y., Meguro,K., Yamaguchi,S., Ishii,H., Watanuki,S., Funaki,Y., Yamaguchi,K., Yamadori,A., Iwata,R., Itoh,M., 2003. Decreased striatal D2 receptor density associated with severe behavioral abnormality in Alzheimer's disease. *Ann.Nucl.Med.* 17, 567-573.
157. Tang,X.C., De Sarno,P., Sugaya,K., Giacobini,E., 1989. Effect of huperzine-A, a new cholinesterase inhibitor, on the central cholinergic system of the rat. *J.Neurosc.Res.* 24, 276-285.
158. Tang,X.C., Han,Y.F., 1999. Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from chinese herb. *CNS Drug Reviews.* 5, 281-300.
159. Tayebati,S.K., El-Assouad,D., Ricci,A., Amenta,F., 2002. Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J.Neuroimmunol.* 132, 147-155.

160. Terry,A.V., Buccafusco,J.J., 2003. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J.Pharm.Exp.Ther.* 306, 821-827.
161. Thomsen,T., Kaden,B., Fisher,J.P., Bickel,U., Barz,H., Gusztony,G., Cervos-Navarro,J., Kewitz,H., 1991. Inhibition of acetylcholinesterase activity in human brain tissue and erythrocytes by galantamine, physostigmine and tacrine. *Eur.J.Clin.Chem.Biochem.* 29, 487-492.
162. Umbricht,D.S., 2000. Neuropathological principles of behavioral disorders in dementia. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* 89, 1362-1365.
163. Utsuki,T., Shoaib,M., Holloway,H.W., Ingram,D.K., Wallace,W.C., Haroutunain,V., Sambamurti,K., Lahiri,D.K., Greig,N.H., 2002. Nicotine lowers the secretion of the Alzheimer's amyloid beta-protein precursor that contains amyloid beta-peptide in rat. *J.Alzheimers Dis.* 4, 405-415.
164. Vaffe,K., Sawaya,G., Lieberburg,I., Grady,D., 1998. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects in cognitive function and dementia. *JAMA* 279, 688-695.
165. Wang,R., Zhang,H.Y., 2001. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by b-amyloid protein-(1-40) in rat. *Eur.J.Pharmacol.* 421, 149-156.
166. Weiner,H.I., Selkoe,D.J., 2002. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. *Nature* 420, 879-884.
167. White,K.E., Cummings,J.L., 1996. Schizophrenia and Alzheimer's disease: clinical and pathophysiologic analogies. *Compr.Psychiatry* 37, 188-195.
168. Wingstrom,H., Gustafsson,B., 1985. Facilitation of hippocampal long-term potentiation by GABA antagonists. *Acta Physiol.Scand.* 125, 159-172.
169. Woodruff-Pak,D.S., Santos,I.S., 2000. Nicotinic modulation in an animal model of a form of associative learning impaired in Alzheimer's disease. *Behav.Brain.Res.* 113, 11-19.
170. Xiao,X.Q., Wang,R., Han,Y.F., Tang,X.C., 2000. Protective effects of huperzine A on b-amyloid₂₅₋₃₅ induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells. *Neurosci.Lett.* 286, 155-158.
171. Xiao,X.Q., Yang,J.W., Tang,X.C., 1999. Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury. *Neurosci.Lett.* 275, 73-76.
172. Xu,H., Gouras,G., Greenfield,J., Vincent,B., Naslund,J., Mazarrelli,L., Fried,G., Jovanovic,J., Checler,F., Sisodia,S., Greengard,P., Gandy,S., 1998. Estrogens reduces neuronal generation of Alzheimer beta amyloid peptides. *Nat.Med.* 4, 447-451.
173. Yamamoto,S., Hirano,A., 1985. Nucleus raphe dorsalis in Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles and loss of large neurons. *Ann.Neurol.* 17, 573-577.

174. Yan,Q., Zhang,J., Liu,H., Babu-Khan,S., Vassar,R., Biere,A.L., Citron,M., Landreth,G., 2003. Anti-inflammatory drug therapy alters beta-amyloid processing and deposition in an animal model of Alzheimer's disease. *J.Neurosci.* 23, 7504-7509.
175. Ye,L., Qiao,J.-T., 1999. Suppressive action produced by b-amyloid peptide fragment 31-35 on long-term potentiation in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-independent: it's offset by (-)huperzine A. *Neurosci.Lett.* 275, 187-190.
176. Zangara,A., 2003. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 75, 675-686.
177. Zhang,L., Zhou,F.M., Dani,J.A., 2004. Cholinergic drugs for Alzheimer's disease enhance in vitro dopamine release. *Mol.Pharmacol.* 66, 538-544.
178. Zhao,Q., Tang,C., 2002. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. *Eur.J.Pharmacol.* 455, 101-107.
179. Zwart,R., Oortgiesen,M., Vijverberg,H., 1995. Differential modulation of $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptors expressed in *Xenopus Oocytes* by flufenamic acid and niflumic acid. *J.Neurosc.* 15, 2168-2178.
180. Zwart,R., van Kleef,R., Gotti,C., Smulders,C., Vijverberg,H., 2000. Competitive potentiation of acetylcholine effects on neural nicotinic receptors by acetylcholinesterase-inhibiting drugs. *J.Neurochem.* 75, 2492-2500.
181. Zwart,R., Vijverberg,H., 1997. Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and not competitive effects. *Mol.Pharmacol.* 52, 886-895.
182. Zweig,R.M., Ross,C.A., Hedreen,J.C., Steele,C., Cardillo,J.E., Whitehouse,P.J., Folstein,M., Price,D.L., 1988. The neuropathology of aminergic nuclei in Alzheimer's disease. *Ann.Neurol.* 24, 233-242

2. Resumen de los resultados y discusión



“La vejez es la cosa más inesperada de todas las que le suceden al hombre”.

Leo Trotski. Político soviético (1879-1940).

2.1. Interacción de un nuevo y potente anticolinérgico, la (±)huprina X, sobre los receptores muscarínicos, en cerebro de rata.

El estudio de la interacción de la (±)huprina X con los receptores muscarínicos, se llevó a cabo mediante el método de unión de radioligandos en membranas de hipocampo y mediante el método de superfusión de sinaptosomas en cortex prefrontal y estriado de rata.

En el estudio de unión de radioligandos se valoró la afinidad de la (±)huprina X sobre los dos tipos de receptores muscarínicos M_1 y M_2 . Dicha afinidad se estudió a través de la competición con la unión específica de la pirenzepina- $[^3H]$ (1 nM) para los receptores M_1 , y de la competición con el quinuclidinylbenzilato- $[^3H]$ (0.8 nM) en presencia de pirenzepina (10 μM) para los receptores muscarínicos M_2 . La unión específica de la pirenzepina- $[^3H]$ (receptores M_1) y el del quinuclidinylbenzilato- $[^3H]$ (receptores M_2), fue inhibida en ambos casos por la (±)huprina X. El análisis de las curvas de competición (Munson and Rodbard, 1980) reveló la existencia de una única población de receptores con un coeficiente de pseudo-Hill cercano a la unidad para ambos receptores (M_1 y M_2). La (±)huprina X mostró una mayor afinidad (14 veces) para el receptor muscarínico M_1 ($K_i=0.338\pm 0.41 \mu M$; n=5) que para el receptor muscarínico M_2 ($K_i=4.66 \pm 0.32 \mu M$; n=4).

Para determinar la naturaleza de esta interacción, se analizó la acción de la (±)huprina X sobre los receptores muscarínicos M_1 y M_2 a través de la modulación de la liberación de dopamina- $[^3H]$ (DA- $[^3H]$) y acetilcolina- $[^3H]$ (ACh- $[^3H]$), respectivamente.

La estimulación de los receptores M_1 en el terminal dopaminérgico incrementa la liberación de DA, mientras que la activación de los receptores M_2 en el terminal colinérgico implica una disminución de la liberación de ACh (De Kippel *et al.*, 1993). La interacción de la (\pm)huprina X sobre el receptor muscarínico M_1 se estudió en terminales dopaminérgicos usando la ACh como agonista y valorando la liberación

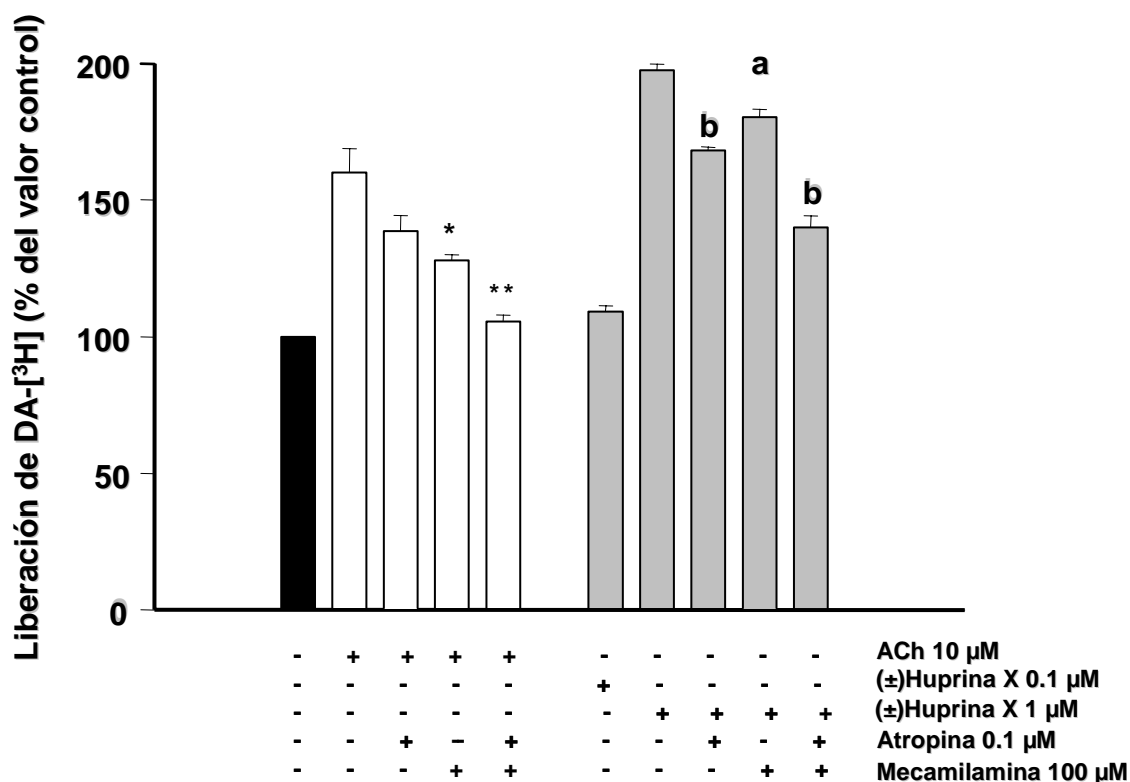


Fig 1 Efecto de la ACh (columnas blancas) y de la (\pm)huprina X (columnas grises) sobre la liberación de DA- 3 H en sinaptosomas de corteza prefrontal de rata. Los resultados están expresados como porcentaje del grupo control. Los datos representan la media \pm ES de al menos 3 experimentos realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo con un ANOVA de una vía seguido de un test de Tukey. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs el grupo de la ACh; ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$ vs. El grupo de la (\pm)huprina X.

de DA- 3 H (**fig 1**). La presencia de (\pm)huprina X (0.1 μ M-1 μ M) indujo un incremento significativo en la liberación de DA- 3 H sólo a la concentración de 1 μ M (97%; $P < 0.001$).

Para determinar si dicho incremento era debido a la estimulación de los receptores M_1 , se añadió atropina, 0.1 μ M, en el medio de superfusión. La presencia de este antagonista muscarínico revirtió el efecto inducido por la (\pm)huprina X en un 30% ($P < 0.001$). Con el fin de determinar si parte del incremento de la liberación de DA era

debido a una interacción de la (\pm)huprina X con los receptores nicotínicos también presentes en el terminal dopaminérgico (Rapier *et al.*, 1990), se estudió el efecto de la (\pm)huprina X, 1 μ M, en presencia de mecamilamina, un antagonista nicotínico, 100 μ M. La presencia de mecamilamina en el medio disminuyó la liberación de DA- $^{[3}H]$ inducida por la (\pm)huprina X en un 18% ($P < 0.02$). Cuando ambos antagonistas, muscarínico y nicotínico, fueron añadidos concomitantemente al medio de superfusión la liberación de DA- $^{[3}H]$ inducida por la (\pm)huprina X se redujo en un 60% ($P < 0.001$).

El efecto de la (\pm)huprina X sobre los receptores muscarínicos M_2 fue estudiado en terminales colinérgicos (James and Cubeddu, 1987) (**fig 2**). La presencia de la (\pm)huprina X (0.01 μ M-10 μ M) en el medio de superfusión indujo una disminución de la liberación de ACh- $^{[3}H]$ (49%; $P < 0.001$), pero únicamente a la concentración de 10 μ M. El efecto inducido por la (\pm)huprina X fue completamente inhibido en presencia de 0.1 μ M atropina.

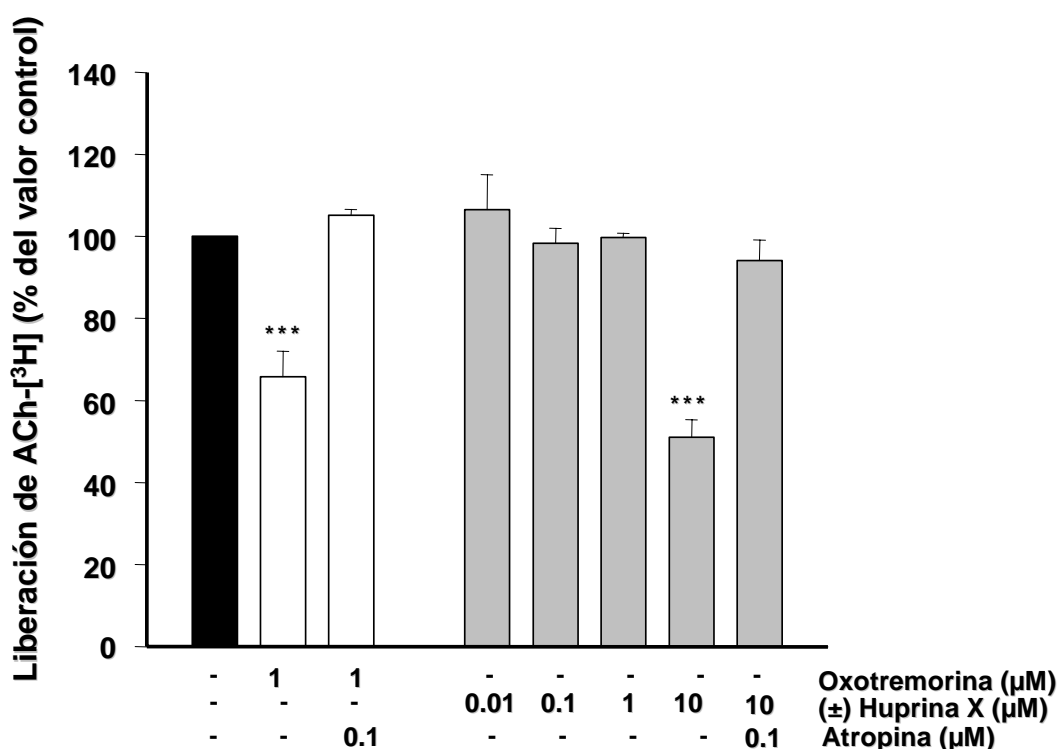


Fig 2 Efecto de la oxotremorina (columnas blancas) y de la (\pm)huprina X (columnas grises) sobre la liberación de ACh- $^{[3}H]$ en sinaptosomas de estriado de rata. Los resultados están expresados como porcentaje del grupo control. Los datos representan la media \pm ES de al menos 3 experimentos realizados por cuadruplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo con un test de t de Student. *** $P < 0.001$ vs el grupo control.

El híbrido tacrina-huperzina A, (\pm)huprina X, desplazó la pirenzepina- ^3H] y el quinuclidinylbenzilato- ^3H] en membranas de hipocampo y mostró una afinidad hacia el receptor muscarínico M_1 14 veces superior a la que mostró por el M_2 . De los resultados obtenidos en los estudios funcionales realizados a nivel del terminal colinérgico y dopaminérgico, se desprende que la (\pm)huprina X actúa como agonista sobre los receptores muscarínicos.

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han sugerido que los agonistas muscarínicos, particularmente los que muestran un efecto selectivo sobre los receptores M_1 , pueden mejorar los síntomas cognitivos de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Korczyn, 2000). En consecuencia, el hecho que la (\pm)huprina X muestre mayor afinidad por los receptores muscarínicos M_1 puede representar una ventaja terapéutica añadida a su actividad anticolinesterásica, sugiriendo que este compuesto también puede ser capaz de estimular de forma efectiva el sistema colinérgico central a través de la activación de los receptores muscarínicos M_1 .

En el terminal dopaminérgico la (\pm)huprina X indujo un incremento significativo de la liberación de ^3H -DA. Este efecto fue debido, sólo en parte, a la activación del receptor muscarínico M_1 , debido a que en presencia de atropina este incremento no fue revertido totalmente. Dada la presencia de receptores nicotínicos en dicho terminal (Rapier *et al.*, 1990) y que su estimulación incrementa la liberación del neurotransmisor, estudiamos el efecto de la (\pm)huprina X en presencia de mecamilamina un bloqueante de los receptores nicotínicos. La presencia de este antagonista puso de manifiesto que parte del incremento de la liberación del neurotransmisor era debida a una acción agonista de la (\pm)huprina X sobre dicho receptor. Este hecho fue de especial relevancia debido no sólo al papel de estos receptores sobre la modulación de la liberación de ACh si no también al papel neuroprotector que ejercen estos receptores.

2.2. Efecto potenciador de la (\pm)huprina X, un nuevo inhibidor de la acetilcolinesterasa, sobre los receptores nicotínicos en sinaptosomas de corteza prefrontal de rata.

En este trabajo se analizó la interacción de la (\pm)huprina X sobre el receptor nicotínico estudiando tanto su efecto directo como el posible efecto potenciador sobre dicho receptor, mediante la técnica de superfusión de sinaptosomas.

En primer lugar se estudió el efecto directo de la (\pm)huprina X sobre los receptores nicotínicos en terminales colinérgicos de tejido cortical de rata (Nilsson *et al.*, 1987), en condiciones basales (3 mM K⁺) (Marchi and Raiteri, 1996), y en presencia de atropina con el fin de bloquear los receptores muscarínicos. En presencia de (\pm)huprina X (1 y 10 μ M), se observó un incremento en la liberación de ACh-[³H] (46%, P<0.01) pero sólo a la concentración de 10 μ M. Este efecto fue revertido completamente por la acción de

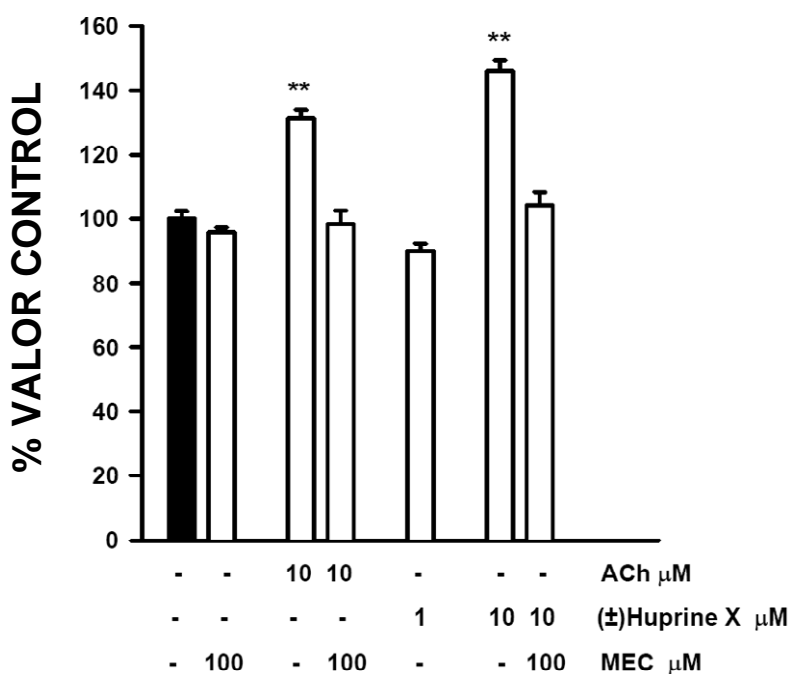


Fig 3 Efecto de la ACh y de la (\pm)huprina X en presencia y ausencia de la mecamilamina (MEC), sobre la liberación basal de ACh-[³H] en sinaptosomas de corteza prefrontal de rata. La atropina estuvo presente durante el estudio para bloquear los receptores M₂. Los resultados se expresaron como porcentaje del grupo control y los datos representan la media \pm ES de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía seguida de un test de Dunett (**P<0.01).

la mecamilamina (100 μ M) (**fig 3**). Cuando el mismo efecto se estudió en condiciones de estimulación (15 mM), la (\pm)huprina X no modificó en ningún modo la liberación de ACh. Sin embargo en las mismas condiciones de estimulación, la (\pm)huprina X

incrementó la liberación de ACh- ^{3}H] inducida por la ACh (1 μM) a las concentraciones de 10 μM (170%; $P<0.01$) y de 30 μM (90%; $P<0.01$) (**fig 4**).

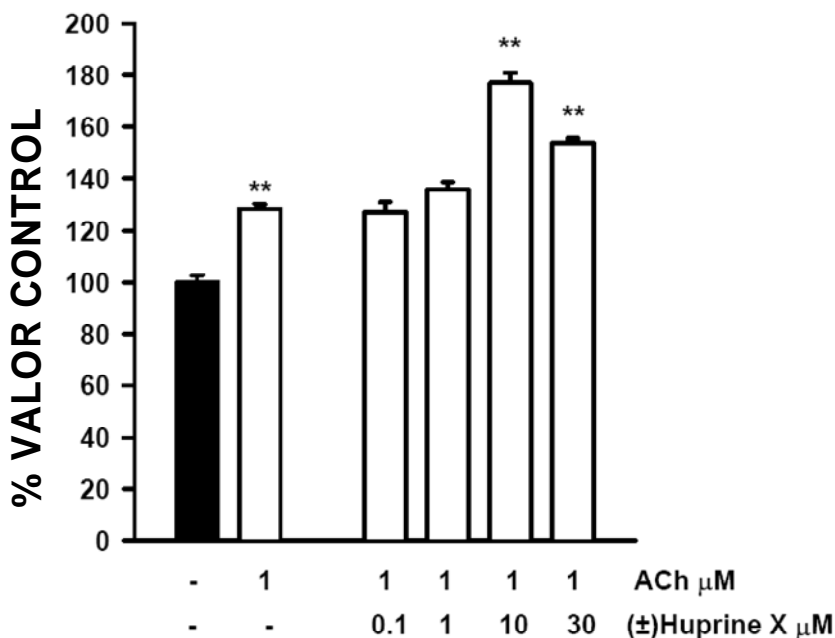


Fig 4 Efecto de la (\pm)huprina X en presencia de la ACh sobre la liberación de ACh- ^{3}H] en sinaptosomas de corteza prefrontal de rata. La atropina estuvo presente durante el estudio para bloquear los receptores M_2 . Los resultados se expresaron como porcentaje del grupo control y los datos representan la media \pm ES de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía seguida de un test de Dunett (** $P<0.01$)

Teniendo en cuenta la concentración de (\pm)huprina X (10 μM) a la que se observó el máximo efecto potenciador de la actividad de la ACh sobre el receptor nicotínico, se estudió la actividad de este compuesto en presencia de un amplio rango de concentraciones de ACh exógena (1 nM-0.1 mM). En estas condiciones el efecto máximo de la (\pm)huprina X se observó a una concentración de ACh de 1 μM (169%; $P<0.05$) y este efecto fue disminuyendo a medida que la concentración de ACh incrementó (ACh $\geq 3 \mu\text{M}$) (**fig 5**).

Dado que el efecto máximo inducido por la (\pm)huprina X se observó a una relación de concentraciones de ACh y (\pm)huprina X de 1:10, se estudió el efecto potenciador de diferentes concentraciones de (\pm)huprina X (0.001-10 μM) en presencia de diferentes

concentraciones de ACh (10 nM-1 mM), manteniéndose en todo momento dicha relación.

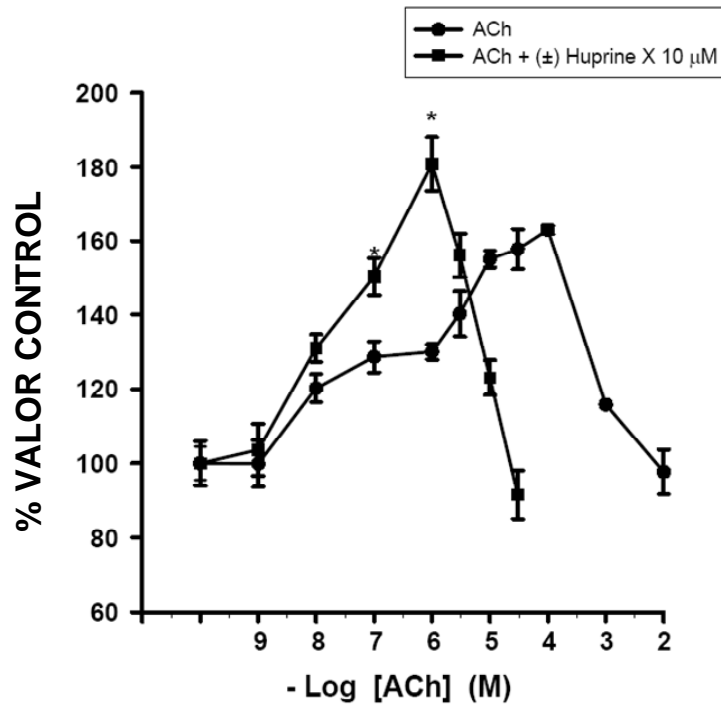


Fig 5 Efecto de diferentes concentraciones de ACh en presencia in en ausencia de (±)huprina X sobre la liberación de ACh-³H en sinaptosomas de cortex frontal de rata. La atropina estuvo presente durante el estudio para bloquear los receptores M₂. Los resultados se expresaron como porcentaje del grupo control y los datos representan la media±ES de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía seguida de un test de Dunett (*P<0.05).

Tal y cómo se observa en la **fig 6**, el efecto potenciador de la (±)huprina X sobre la liberación de ACh-³H fue significativo a las concentraciones de (±)huprina X de 0.1, 1 y 10 μM (P<0.05). La presencia de mecamilamina (100 μM) bloqueó por completo tanto el efecto de la ACh como el de la (±)huprina X.

Los resultados obtenidos, demostraron que la (±)huprina X (10 μM) no sólo muestra un efecto agonista sobre los receptores nicotínicos, en condiciones basales, sino que

además potencia la liberación estimulada de ACh- ^3H] inducida por la ACh a través de los receptores nicotínicos.

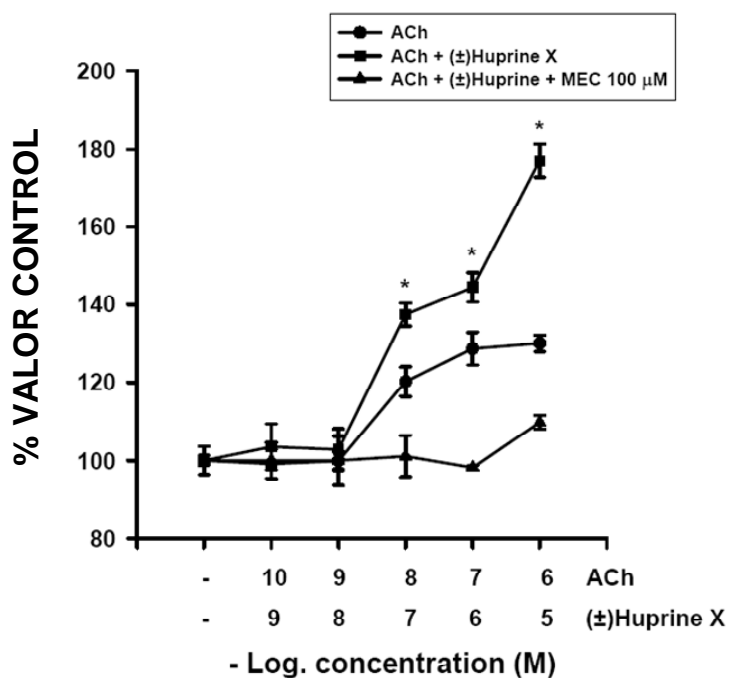


Fig 6 Efecto de la ACh (10 nM-1 mM) en presencia in en ausencia de (±)huprina X (0.001-10 μM) sobre la liberación de ACh- ^3H] en sinaptosomas de cortex frontal de rata. La atropina estuvo presente durante el estudio para bloquear los receptores M_2 . Los resultados se expresaron como porcentaje del grupo control y los datos representan la media±E5 de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía seguida de un test de Dunett (**P<0.01)

Las diferencias de los efectos observados entre las condiciones basales y de estimulación, sugieren que la sensibilidad de los receptores nicotínicos probablemente difiere dependiendo del grado de despolarización de la membrana celular. De acuerdo con esto, se ha descrito que cambios en el voltaje de la membrana celular neuronal induce diferentes respuestas del receptor nicotínico, de la misma manera cómo ocurre con otros receptores asociados a canales iónicos (Johnson and Ascher, 1987; Mayer *et al.*, 1989). Esto explicaría el porqué el efecto potenciador por parte de la (±)huprina X sobre la liberación de ^3H -ACh, sólo fue evidente en condiciones de estimulación. Podría ser debido a que en estas condiciones el sitio alostérico del receptor nicotínico se modifica para pasar a una forma activa, induciendo cambios en las propiedades farmacológicas del receptor nicotínico. Estos cambios darían como resultado una respuesta mayor tras la estimulación por el agonista endógeno (ACh)

cuando el ligando alostérico está presente. La (\pm)huprina X incrementó la liberación de ACh- ^3H] inducida por ACh (1 μM) a las concentraciones de 10 y 30 μM , sugiriendo una modulación positiva de la (\pm)huprina X específicamente sobre los receptores nicotínicos debido a que la presencia de mecamilamina antagonizó completamente esta acción.

La presencia de la (\pm)huprina X a una concentración de 10 μM concomitantemente con la ACh en un rango de concentraciones de entre 1 nM y 0.1 mM, puso de manifiesto que el efecto de potenciación fue máximo cuando la relación de concentraciones entre ambos compuestos fue de 1:10. Además cuando la concentración de ACh fue $\geq 3 \mu\text{M}$ la liberación de ACh- ^3H] se redujo. Estos resultados son consistentes con una desensibilización de los receptores nicotínicos debida a la presencia de concentraciones elevadas de ACh (Marchi *et al.*, 1999). Además cabe destacar que la (\pm)huprina X potenció los efectos inducidos por la ACh sobre los receptores nicotínicos, incluso a bajas concentraciones del neurotransmisor (0.01 μM). Este hecho es de especial importancia sobre todo en aquellas condiciones en las que existe un daño severo en el sistema colinérgico tal como se ha descrito en la EA (Giacobinni, 1998). Además el hecho de que la (\pm)huprina X interactúe con el receptor nicotínico abre nuevas posibilidades dado el papel de los receptores nicotínicos en los procesos de neuroprotección.

2.3. Los fármacos potenciadores de la respuesta nicotínica (\pm)huprina X y galantamina, incrementan la liberación de ACh a través del bloqueo de la actividad de la AChE, pero no actuando sobre los receptores nicotínicos.

El principal objetivo de este trabajo fue el de valorar el efecto inducido por la (\pm)huprina X y la galantamina (ambos potenciadores del receptor nicotínico) y la huperzina A (exenta de este efecto) sobre la liberación de ACh- ^3H] en cortes de tejido estriado de rata, con el fin de caracterizar el efecto potenciador sobre dichos receptores, en un sistema integrado en el que la presencia de distintos neurotransmisores y neuromoduladores pueden modificar la respuesta de estos fármacos sobre la liberación del neurotransmisor.

En primer lugar se estudió el efecto de la (\pm)huprina X (0.01 μ M), la galantamina (10 μ M) y la huperzina A (0.1 μ M) sobre la liberación estimulada de ACh-[3 H]. En esas condiciones, los tres anticolinesterásicos indujeron una disminución significativa de la liberación de ACh-[3 H] (36%, 30% y 34% respectivamente; $P < 0.01$), efecto que fue completamente revertido en presencia de atropina a una concentración de 0.1 μ M.

Con el fin de poner de manifiesto el posible efecto de estos fármacos sobre los receptores nicotínicos, los siguientes experimentos se realizaron en presencia de atropina (0.1 μ M); la (\pm)huprina X (0.001-10 μ M), la galantamina (0.001-100 μ M) y la huperzina A (0.001-100 μ M), se estudiaron a un amplio rango de concentraciones. Como se observa en la **fig 7**, no se detectó ninguna modificación significativa en la liberación de ACh-[3 H], excepto en el caso de la (\pm)huprina X (10 μ M), donde se observó un descenso significativo de la liberación del neurotransmisor (20%; $P < 0.05$).

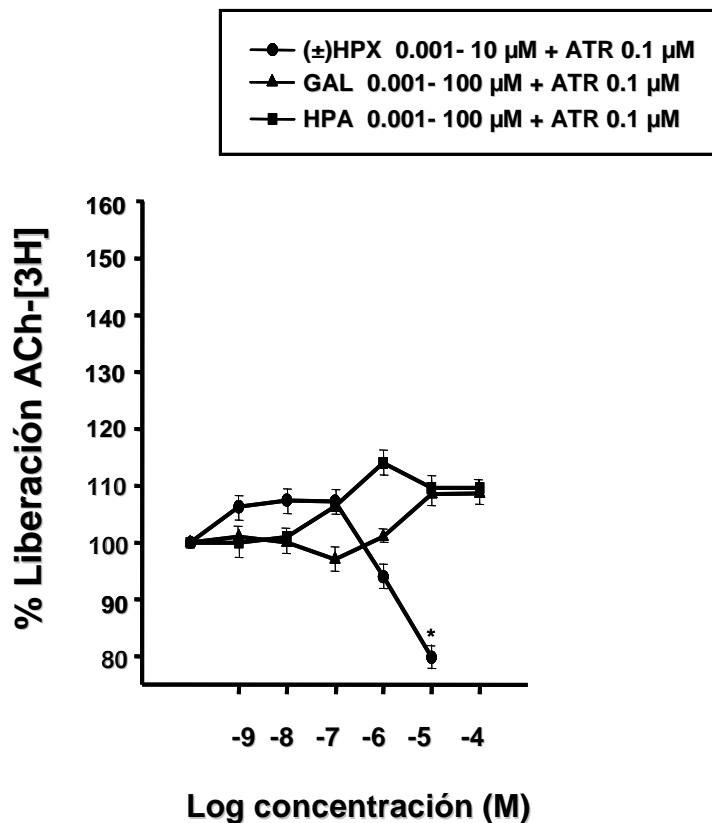


Fig 7. Efecto de la (\pm)huprina X(\pm)HPX), la galantamina (GAL) y la huperzina A (HPA) sobre la liberación estimulada de la ACh-[3 H] en tejido estriado de rata en presencia de la atropina (ATR) (0.1 μ M). Los resultados están expresados como el porcentaje del grupo control y los datos representan la media \pm EE de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevo a cabo mediante un test de t-Student seguido de un test de Bonferroni (* $P < 0.05$ incluyendo la corrección del test de Bonferroni).

Dada la influencia del receptor D_2 sobre la liberación de la ACh (De Boer and Abercrombie, 1996; Bloomquist *et al.*, 2002), junto con el hecho que la liberación de DA está bajo la modulación de los receptores nicotínicos (Champtiaux *et al.*, 2003) y muscarínicos (Champtiaux *et al.*, 2003; Login, 1996), se estudió el efecto de la (\pm)huprina X, la galantamina y la huperzina A sobre la liberación de la ACh-[3 H] en presencia de la atropina y de haloperidol (0.01 μ M), un antagonista de los receptores D_2 . Como puede observarse (**fig 8**), los tres IChE incrementaron la liberación de ACh-[3 H] a concentraciones superiores a 0.1 μ M. La (\pm)huprina X y la huperzina A, incrementaron en un porcentaje similar la liberación de ACh-[3 H] (49% y 51% respectivamente; $P < 0.01$), mientras que la galantamina lo hizo en un porcentaje sensiblemente inferior (30%; $P < 0.01$).

Debido a que la (\pm)huprina X (Román *et al.*, 2003) y la galantamina (Albuquerque and Pereira, 2000) potencian la actividad del receptor nicotínico en presencia del agonista endógeno, se estudió el efecto de los tres compuestos en presencia de atropina y de mecamilamina (100 μ M), un antagonista de los receptores nicotínicos (**fig 9**). En estas condiciones, la (\pm)huprina X, la galantamina y la huperzina A aumentaron significativamente la liberación de ACh-[3 H] de forma concentración dependiente. (37%, $P < 0.01$; 25%, $P < 0.05$ y 38%, $P < 0.01$ respectivamente).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen de manifiesto que la presencia

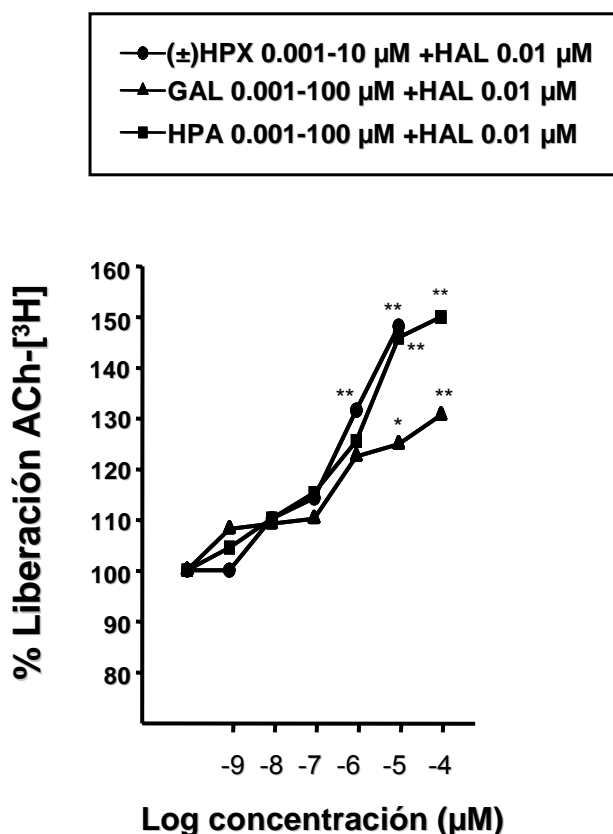


Fig 8. Efecto de la (\pm)huprina X((\pm)HPX), la galantamina (GAL) y la huperzina A (HPA) sobre la liberación estimulada de la ACh-[3 H] en tejido estriado de rata en presencia de la atropina (ATR) (0.1 μ M) y haloperidol (HAL) (0.01 μ M). Los resultados están expresados como el porcentaje del grupo control y los datos representan la media \pm EE de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un test de Student seguido de un test de Bonferroni (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ incluyendo la corrección del test de Bonferroni).

de neuromoduladores y neurotransmisores en el entorno sináptico, modifica la respuesta de potenciación sobre los receptores nicotínicos inducidos por la (\pm)huprina X (Román *et al.*, 2003) y la galantamina (Albuquerque and Pereira, 2000; Samochocki *et al.*, 2003).

Se ha sugerido que la eficacia de ciertos IChE tales como la galantamina, es debida a su capacidad para potenciar la actividad de los receptores nicotínicos más que por su efecto anticolinesterásico (Olin and Schneider, 2002). No obstante, dicho efecto potenciador tan sólo ha sido estudiado, y por ende observado, en sistemas aislados en ausencia de los distintos neurotransmisores que regulan el terminal colinérgico (Román *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 1993).

La (\pm)huprina X, la galantamina y la huperzina A, a concentraciones cercanas a su IC_{50} , inhibieron de forma similar la liberación de ACh- 3H y este efecto fue revertido en presencia de atropina. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos por otros autores con IChE en estudios *in vitro* (Feuerstein *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2002). Sin embargo, dado que tanto la (\pm)huprina X como la galantamina poseen la capacidad de potenciar el efecto de la ACh sobre el receptor nicotínico, la presencia de la atropina debería evidenciar esta capacidad dando lugar a un incremento significativo de la liberación de ACh- 3H .

Es ampliamente conocido el hecho que el terminal colinérgico está sometido a una regulación negativa por parte de la DA (Laplante *et al.*, 2004; Baud *et al.*, 1985), a través de los receptores D_2 de la dopamina (Wonnacott *et al.*, 2000; Middleton *et al.*, 2003; Middleton *et al.*, 2004). En presencia de la atropina los IChE podrían activar, de forma directa o indirecta, los receptores nicotínicos del terminal dopaminérgico, aumentando la liberación de la DA que a su vez podría inhibir la liberación de ACh en el terminal colinérgico, a través del receptor D_2 localizado en dicho terminal. En presencia de atropina (0.1 μM) y haloperidol (0.01 μM), la (\pm)huprina X, la galantamina y la huperzina A incrementaron de forma significativa y de forma concentración dependiente, la liberación de ACh- 3H (49%, 30% y 51% respectivamente; $P < 0.01$).

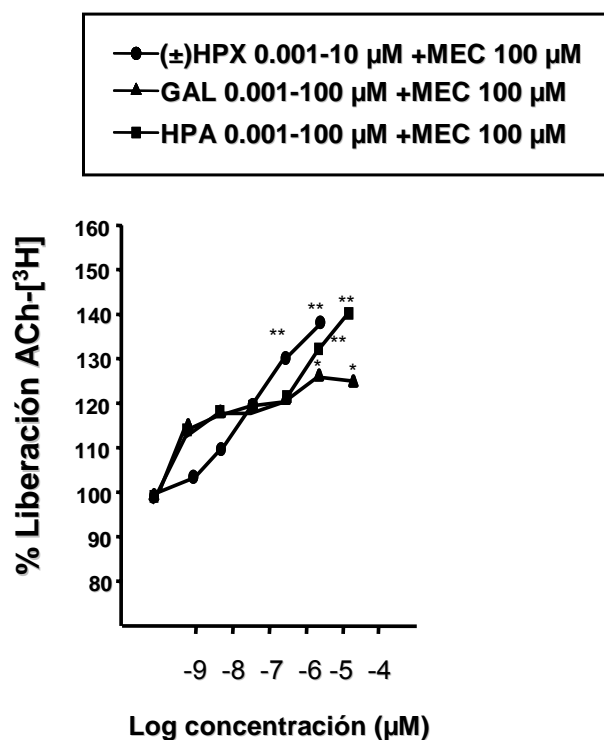


Fig 9. Efecto de la (±)huprina X((±)HPX), la galantamina (GAL) y la huperzina A (HPA) sobre la liberación estimulada de la ACh-[³H] en tejido estriado de rata en presencia de la atropina (ATR) (0.1 µM) y mecamilamina (MEC) (100 µM). Los resultados están expresados como el porcentaje del grupo control y los datos representan la media ± EE de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un test de Student seguido de un test de Bonferroni (** P < 0.01 y * P < 0.05, incluyendo la corrección del test de Bonferroni).

Cuando se estudió el efecto de los IChE en presencia de la mecamilamina (100 µM), los tres compuestos indujeron un incremento en la liberación de ACh-[³H] (37%, 25% y 38% respectivamente), si bien en este caso, el incremento, fue sensiblemente inferior al observado en presencia de atropina y haloperidol. En ambos casos la liberación de ACh-[³H] inducida por los IChE, presentó un perfil similar, siendo la galantamina la que indujo una menor liberación de neurotransmisor, mientras que la (±)huprina X y la huperzina A dieron lugar a un mayor porcentaje de liberación del mismo.

Si bien se ha sugerido que la eficacia de la galantamina en el tratamiento de la EA es debida principalmente al efecto potenciador de la actividad del receptor nicotínico (Maelicke *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2002), los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que el incremento de la liberación de la ACh-[³H], estaría más relacionado con un efecto anticolinesterásico que con un efecto potenciador sobre los

receptores nicotínicos. Sin embargo no puede descartarse que este efecto potenciador pueda ser de especial interés en condiciones en las que el nivel de ACh sea especialmente bajo, como en el caso de la EA. Podría ser que en tales condiciones los IAChE incrementaran los niveles de neurotransmisor mediante ambos mecanismos.

2.4. Efecto de la acetilcolinesterasa sobre la agregación del péptido priónico

PrP₁₀₆₋₁₂₆.

Dado que se ha descrito que la AChE induce la agregación de la proteína β A, el objetivo de este trabajo fue el de analizar el posible efecto proagregante de la AChE sobre la proteína priónica PrP₁₀₆₋₁₂₆ (K¹⁰⁶TNMKHMAGAAAAGAVVGGGLG) de características amiloidogénicas parecidas a la β A, y valorar además el efecto antiagregante de la (\pm)huprina X.

La agregación espontánea de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ (1 mM) después de 72 horas de incubación, se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tras la separación de las formas agregada (fracción del precipitado) y soluble (fracción del sobrenadante) mediante centrifugación. De acuerdo con estudios previos (De Giogia *et al.*, 1994) tras la incubación de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ se observó que aproximadamente el 80% del péptido se hallaba en forma agregada mientras que el 20% restante permanecía en forma soluble (**fig 10**).

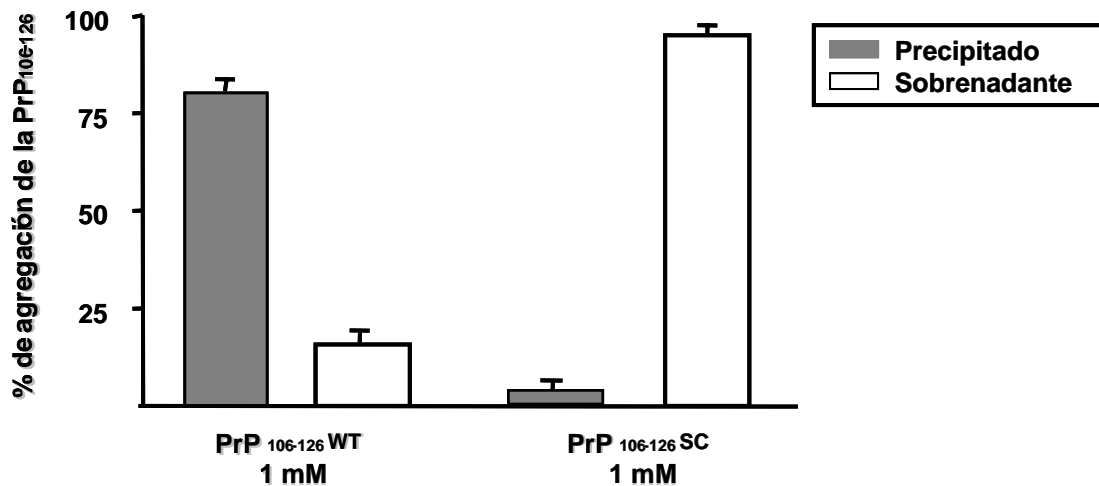


Fig 10 Los resultados expresan el porcentaje de la proteína PrP₁₀₆₋₁₂₆ (1 mM) wild type (WT) y scramble (SC), recogida en la fracción del precipitado (proteína agregada) y en la fracción del sobrenadante (proteína en suspensión) después de 72 horas de incubación a 25°C. Los resultados están expresados como la media±EE de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado.

Cuando la incubación de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ se realizó en presencia de la AChE (2,5 μM) la fracción agregada de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ disminuyó drásticamente hasta un 25,8%. Así mismo el porcentaje de PrP₁₀₆₋₁₂₆ soluble fue solo de un 2,8% del total de la proteína incubada (**fig 11**). El hecho de que el contenido total de PrP₁₀₆₋₁₂₆ en ambas fracciones, precipitado más sobrenadante, fuera de sólo el 28,6% se debió probablemente a que en presencia de la AChE el tamaño de los agregados era tal que no permitió el paso de los mismos a través del filtro de la columna de cromatografía. Ni el ácido fórmico ni la enzima proteína quinasa K fueron capaces de solubilizar dichos agregados.

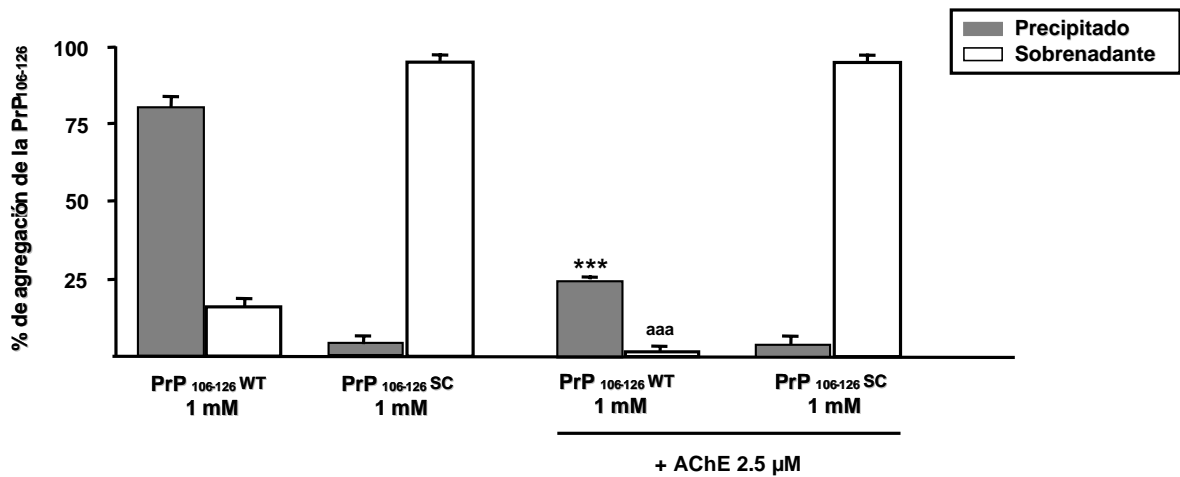


Fig 11 Los resultados expresan el porcentaje de la proteína PrP 106-126 (1 mM) *wild type* (WT) y *scramble* (SC), recogida en la fracción del precipitado (proteína agregada) y en la fracción del sobrenadante (proteína en suspensión) en ausencia y en presencia de AChE (2.5 μM) después de 72 horas de incubación a 25°C. Los resultados están expresados como la media±EE de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett (***) P<0.001 vs el resultado del precipitado de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ WT obtenido en ausencia de AChE; **aaa** P<0.001 vs. el resultado del sobrenadante de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ WT obtenido en ausencia de la AChE.

Se ha demostrado que el yoduro de propidio, un IChE específico del sitio periférico, tiene la capacidad de bloquear el efecto proagregante de la AChE sobre la βA (Álvarez *et al.*, 1998; Bartolini *et al.*, 2003). Cuando el yoduro de propidio (0.1, 1, 10 y 100 μM) fue incluido en el medio de incubación, incrementó de forma significativa el contenido de PrP₁₀₆₋₁₂₆ en la fracción del precipitado hasta un 50% y 68% a las concentraciones de 10 y 100 μM, respectivamente (**fig 12**).

Dados los resultados obtenidos con el yoduro de propidio, se estudió el efecto de la (±)huprina X y la huperzina A sobre la capacidad proagregante de la AChE. La (±)huprina X (0.01, 0.1, 1 mM) indujo un incremento significativo del contenido del precipitado a las concentraciones más elevadas estudiadas (48% 0.1 mM; P<0.05 y 51% 1 mM; P<0.05) respecto al del precipitado de las muestras carentes de (±)huprina X (**fig 12**).

La huperzina A (1 mM) no indujo cambio alguno en la capacidad proagregante de la AChE (**fig 12**).

Estos resultados preliminares constituyen la base de un estudio más amplio sobre la interacción de la AChE y la PrP₁₀₆₋₁₂₆ que se está llevando a cabo en el laboratorio de Farmacología Terapéutica y Toxicología de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los estudios de agregación realizados en presencia de la AChE sugieren que al igual que se ha descrito para la proteína β A, la enzima es capaz de inducir la agregación de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ y que, por otro lado, los compuestos que bloquean el sitio periférico del enzima, inhiben dicha agregación.

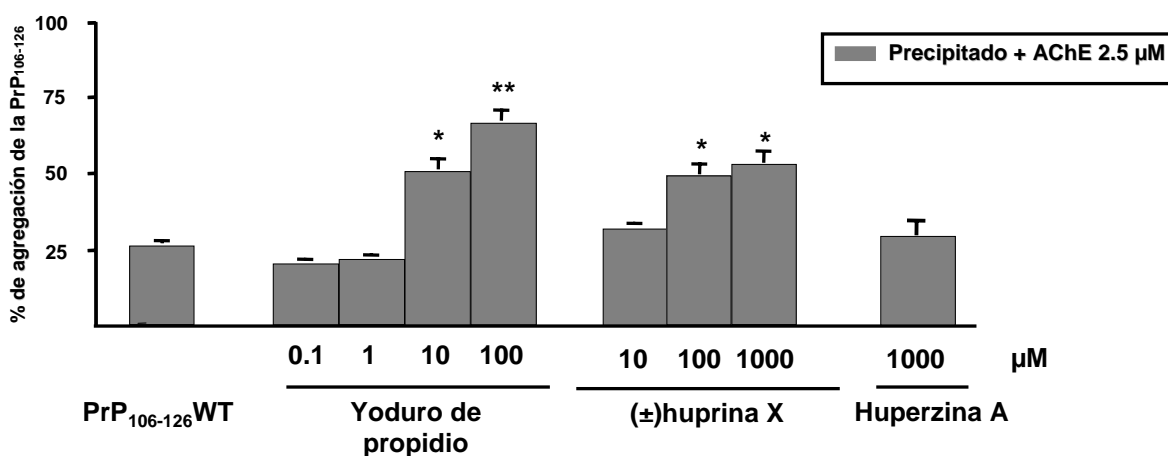


Fig 12. Los resultados expresan el porcentaje de proteína PrP₁₀₆₋₁₂₆ *wild type* (WT), recogida en la fracción del precipitado (proteína agregada), después de 72 horas de incubación a 25°C, en presencia de AChE y en ausencia y en presencia de ioduro de propidio (0.1-100 μM), (±)huprina X (10, 100 y 1000 μM) y huperzina A (1000 μM). Los resultados están expresados como la media±EE de al menos cuatro experimentos realizados por triplicado. La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un test de ANOVA de una vía seguida de un test de Dunett (** P<0.01 y * P<0.05 vs al resultado obtenido en presencia de AChE y en ausencia de ioduro de propidio y (±)huprina X respectivamente).

Tal como se ha descrito anteriormente, en presencia de la AChE el contenido de PrP₁₀₆₋₁₂₆ en el sedimento y en el sobrenadante disminuyó drásticamente debido probablemente al tamaño de los agregados formados en presencia de la enzima. Aunque debido a ello no fue posible cuantificar la agregación de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ inducida por la AChE, el hecho de que entre el sobrenadante y el sedimento se detectara tan solo el 28,6% del total de la proteína priónica presente en el medio de incubación, sugiere que aproximadamente el 71% del péptido se halla probablemente en forma de agregados de gran tamaño. El hecho de que el proceso de agregación espontánea de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ presenta características similares a las de la proteína β A, sugiere que el efecto proagregante de la AChE sobre la PrP₁₀₆₋₁₂₆ podría darse en

forma y condiciones parecidas a las descritas para la β A. Así se ha observado que la AChE establece una fuerte unión intermolecular con la proteína β A (Campos *et al.*, 1998), por lo que dicha unión podría ser de la misma naturaleza en el caso de la PrP₁₀₆₋₁₂₆

Esta relación entre el sitio periférico de la enzima y el efecto proagregante, se demostró mediante el uso de inhibidores selectivos de dicho sitio, tales como el yoduro de propidio. Así, se ha demostrado que este inhibidor de la AChE bloquea el efecto proagregante sobre la proteína β A (Bartolini *et al.*, 2003). En el presente trabajo el yoduro de propidio (100 μ M) revierte en, aproximadamente, un 85% el efecto proagregante de la AChE sobre la PrP₁₀₆₋₁₂₆. Estos datos sugieren que de la misma manera que sucede con la β A, la PrP₁₀₆₋₁₂₆ interacciona con la AChE a nivel del sitio periférico de la enzima. Un efecto similar al del propidio se ha observado en el caso de la (\pm)huprina X, que a una concentración de 0.1 mM y 1 mM revierte la agregación de la PrP₁₀₆₋₁₂₆ inducida por la ACh en un 62% y 65% respectivamente. En el caso de la huperzina A (1 mM), sin embargo, no se observó efecto alguno sobre la capacidad proagregante de la AChE.

Si bien se trata de resultados preliminares, el interés e importancia de los mismos se centra, no tan sólo en el hecho de que la ACh induce la agregación de la proteína criónica, sino también en que la (\pm)huprina X y posiblemente otras huprinas, inhiben dicho proceso.

Nota: Las referencias bibliográficas incluidas en este apartado se han insertado respetando las incluidas en cada uno de los trabajos a los que se hace referencia con el fin de evitar repeticiones bibliográficas.

3. Artículos publicados



“Si quieres ser viejo mucho tiempo, hazte viejo pronto”.

Marco Tullio Cicerone. Político y escritor romano (106 a.C.-43 a.C.)

Interaction of a new potent anticholinesterasic compound (±)huprine X with muscarinic receptors in rat brain

S. Roman, N.M. Vivas, A. Badia, M.V. Clos*

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Received 24 January 2002; received in revised form 7 March 2002; accepted 8 March 2002

Abstract

The interaction of rac-12-amine-3-clor-6,7,10,11-tetrahydro-9-ethyl-7-11-methanecyclo-octane[b]quinoline ((±)huprine X) with M₁ and M₂ receptors has been studied in rat brain. Specific binding of [³H]pirenzepine or [³H]quinuclidinylbenzylate to hippocampus preparations was inhibited by (±)huprine X. This drug displayed a greater affinity for M₁ ($K_i = 0.338 \pm 0.41 \mu\text{M}$) than M₂ ($K_i = 4.66 \pm 0.32 \mu\text{M}$) receptors. In functional studies, (±)huprine X (1 μM) increased the release of [³H]dopamine in cortical synaptosomes, and this effect was partially reverted by atropine and mecamylamine, suggesting an agonistic effect on both M₁ and nicotinic receptors. The inhibitory effect of (±)huprine X (10 μM) on [³H]acetylcholine release and the subsequent reversion by atropine suggests that the drug also has an agonist effect on M₂ receptors. The present results demonstrate that this acetylcholinesterase inhibitor has an ample cholinergic profile, which suggests a potential source of interest of (±)huprine X in Alzheimer's disease therapy. © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Muscarinic receptors; Acetylcholinesterase inhibitor; Nicotinic receptors

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder associated with the rapid decline of cognitive functions, behavioral disturbances, and shows a distinctive neuropathology. It is well known that in AD, cholinergic pathways projecting from basal forebrain regions are disrupted, and neurons ultimately die in several brain regions including the hippocampus and basal forebrain [3]. This results in a dramatic decrease of acetylcholine (ACh) and its synthetic enzyme, choline acetyltransferase, in these brain regions. Although acetylcholinesterase (AChE) may be affected in AD, controversial data exist about changes in muscarinic receptors [8,15]. Nevertheless, several of these studies point out a loss in muscarinic receptors in AD postmortem brain tissue.

AD drug-development strategies have been focused on the increase in cholinergic transmission in the brain. Cholinergic agonists and acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) have shown efficacy in treating the symptoms of AD [5,10]. AChEIs, which enhance cholinergic transmission by reducing the enzymatic degradation of ACh, such as tacrine, donepezil, rivastigmine or galantamine, are the only class

of drugs approved for the treatment of AD [13]. Much work has been carried out to obtain more potent, selective and safe AChEIs. Huperzine A, an alkaloid isolated from *Huperzia serrata*, has been proposed as a potent drug for treating AD [2].

A recent new group of reversible AChEIs, tacrine-huperzine A hybrids (Huprines), has been demonstrated to show a potent inhibitory action on AChE in either in vitro or ex vivo studies [1,4]. Rac-12-amine-3-clor-6,7,10,11-tetrahydro-9-ethyl-7-11-methanecyclo-octane[b]quinoline ((±)huprine X) showed an IC₅₀ value in bovine and human AChE in the nanomolar range ($4.23 \pm 0.86 \text{ nM}$ and $0.78 \pm 0.02 \text{ nM}$, respectively), while its activity in human butyryl cholinesterase is approximately over 100 times lower than in AChE [4]. Given that huprine compounds have potential interest for the treatment of AD, the main goal of the present study was to analyze the cholinergic profile of (±)huprine X on muscarinic M₁ and M₂ receptors using radioligand binding and functional studies (synaptosomal superfusion method).

Male Sprague–Dawley rats (250–350 g) were used and the experimental protocols performed in the present study were approved by the Universitat Autònoma de Barcelona Committee for ethical experiments on laboratory animals, License Number 806. Rats were killed by decapitation, and

* Corresponding author. Tel.: +34-93581-1952; fax: +34-93581-2986.

E-mail address: victoria.clos@uab.es (M.V. Clos).

the hippocampus in binding studies or striatum and frontal cortex in release studies were quickly dissected on ice.

For binding studies, rat hippocampus was homogenized in 150 vol. (w/v) of ice-cold 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, using a Polytron homogenizer (setting 5, 3 × 5 s). The potency of (±)huprine X in competing for the specific binding of 1 nM [³H]pirenzepine (M₁ receptors) or 0.8 nM [³H]quinuclidinylbenzylate ([³H]QNB) in the presence of 10 μM pirenzepine (for M₂ muscarinic receptors) was determined in triplicate by incubation of increasing concentrations of the drug to a final volume of 250 μl. Incubation was carried out at 25 °C for 1 (M₁ receptors) or 2 h (M₂ receptors) and stopped by rapid vacuum filtration (Brandel M24R Cell Harvester) through glass-fiber filters (Schleicher & Schuell, No. 30). Filters were rinsed with 5 ml of ice-cold buffer three times. The radioactivity retained was measured by liquid scintillation spectrometry in a LKB (1209 Rack-beta) counter with a counting efficiency of 60%. To define non-specific binding, 1 μM atropine was used. The affinity constants (*K_i*) were determined by non-linear regression analysis using the RADLIG program package (Biosoft; Cambridge, UK).

In the functional studies, the interaction of (±)huprine X, an AChEI, on muscarinic M₁ and M₂ receptors was analyzed through the modulation of [³H]dopamine (DA) and [³H]ACh release, respectively, using a synaptosomal superfusion method. This experimental approach, in which synaptosomes are monolayered and under continuous superfusion, avoid possible interactions of neurotransmitters and/or neuromodulators present in the physiological environment with [³H]DA and [³H]ACh release processes [9]. Crude synaptosomal fractions from the frontal cortex or striatum were prepared essentially as previously described [9]. Synaptosomes were incubated in standard medium (composition: 125 mM NaCl; 3 mM KCl; 1.2 mM MgSO₄; 1.2 mM CaCl₂; 22 mM NaHCO₃; 1 mM NaHPO₄; 10 mM glucose; adjusted to pH 7.2–7.4 by gassing with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂) in the presence of 30 μM pargyline, 100 nM desipramine and 30 nM [³H]DA (40–48 Ci mmol⁻¹) for DA release studies, and 30 nM of [³H]choline (69 Ci μmol⁻¹) for ACh release studies. After 15 min of incubation at 37 °C, aliquots of synaptosomal suspension (240 μg protein/chamber) were distributed on 0.65 μm filters placed at the bottom of a set of parallel superfusion chambers maintained at 37 °C [17]. After 38 min of superfusion, three separate fractions (2.5, 5 and 2.5 min) were collected. Synaptosomes were depolarized with 15 mM K⁺ for 90 s at the end of the first fraction collected and (±)huprine X was added concomitantly with the depolarizing medium. Antagonists (atropine and mecamylamine (MEC)) were added to the medium 8 min earlier than agonists.

Results are given as the means ± SEM. The Student's *t*-test (two-tailed) or a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, was used to analyze statistical differences among means. Differences were established at *P* < 0.05.

Specific binding of [³H]pirenzepine (M₁ receptors) or [³H]QNB to hippocampal preparation was inhibited by (±)huprine X. Iterative non-linear curve-fitting analysis [16] of competition curves revealed the existence of a single population of receptors with pseudo-Hill coefficients close to unity (0.88 ± 0.01 and 1.23 ± 0.01 for muscarinic M₁ and M₂ receptors, respectively). Interestingly, (±)huprine X displayed a 14-fold greater affinity for muscarinic M₁ (*K_i* = 0.338 ± 0.41 μM; *n* = 5) than for M₂ (*K_i* = 4.66 ± 0.32 μM; *n* = 4) receptors.

To clarify the pharmacological profile of (±)huprine X on muscarinic M₁ and M₂ receptors, the modulatory effect of the drug on [³H]DA and [³H]ACh release was studied. Taking into account that activation of muscarinic M₁ receptor induces an increase of DA release [6], the interaction of (±)huprine X on the muscarinic M₁ receptor was determined in dopaminergic nerve terminals using ACh as an agonist. This neurotransmitter (10 μM) significantly increased the evoked-[³H]DA release (*P* < 0.001; Fig. 1). On the other hand, (±)huprine X (100 nM, 1 μM) induced a significant increase in evoked-[³H]DA release only at the highest drug concentration (97%; *P* < 0.001). Atropine (100 nM), a muscarinic receptor antagonist, partially reverted the induced evoked-[³H]DA release by both ACh (36%; *P* < 0.05) and (±)huprine X (30%; *P* < 0.001). As the presence of nicotinic receptors in DA nerve terminals has been described [18], MEC (100 μM), a nicotinic receptor antagonist, was added to the superfusion medium. In these conditions, MEC decreased the induced evoked-[³H]DA release by both ACh, by 54% (*P* < 0.01), and (±)huprine X, by 18% (*P* < 0.02). When muscarinic and nicotinic receptor antagonists were added concomitantly to the superfusion medium, the effect of ACh completely

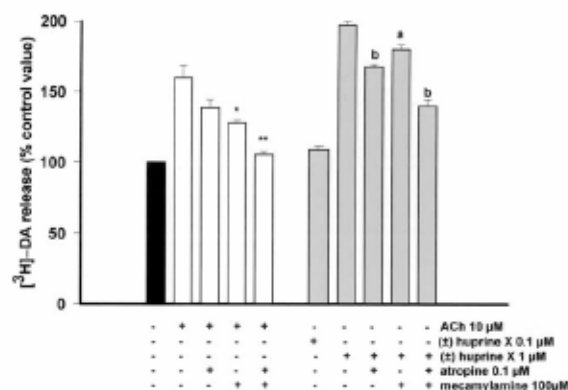


Fig. 1. Effect of ACh (white columns) and (±)huprine X (gray columns) on evoked-[³H]DA release in rat cortex synaptosomes (details in text). Black column represents the control values. Results were expressed as a percentage of the control group. Data are the means ± SEM of at least 3–5 experiments run in quadruplicate. Statistical evaluation was performed by means of one-way ANOVA followed by Tukey's test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus ACh group; ^a*P* < 0.01, ^b*P* < 0.001 versus (±)huprine X group.

reverted, while the effect of (\pm)huprine X was only reduced by 60% ($P < 0.001$).

The effect of (\pm)huprine X on muscarinic M_2 receptors was studied on striatal cholinergic nerve terminals. It is known that activation of muscarinic M_2 presynaptic receptors decreases ACh release [11]. In fact, oxotremorine (1 μ M; muscarinic agonist) significantly inhibited the evoked- $[^3H]ACh$ release (34.22%; $P < 0.001$; Fig. 2) in our experimental conditions. The presence of (\pm)huprine X (10 nM–10 μ M) in the superfusion medium decreased the evoked- $[^3H]ACh$ release by 49% ($P < 0.001$), but only at the highest concentration of drug employed (10 μ M). The effect of both, oxotremorine and (\pm)huprine X, on evoked- $[^3H]ACh$ release was completely abolished by atropine 100 nM.

In the present study, the capacity of the (\pm)huprine X, an AChEI, to interact with muscarinic M_1 and M_2 receptors was analyzed by using binding and neurotransmitter release studies. Several *in vivo* and *in vitro* studies have suggested that muscarinic agonists, particularly those with selective M_1 effects, can ameliorate the cognitive symptoms of AD [12]. It has been demonstrated that tacrine [20] and other AChE inhibitors [14] bind to muscarinic M_1 and M_2 receptors showing an agonistic action, nevertheless, no data exist concerning the interaction of huperzine A with muscarinic receptors. The tacrine–huperzine A hybrid, (\pm)huprine X, showed an ability to displace $[^3H]$ pirenzepine and $[^3H]$ QNB binding in hippocampus membranes displaying a 14-fold greater affinity for the muscarinic M_1 rather than for the M_2 receptor. These results are quite similar to those described in tacrine binding studies [20]. However, (\pm)huprine X showed a greater affinity for M_1 receptors than that described of tacrine.

It is known that DA release is increased by activating muscarinic M_1 receptors [6]. Consequently, to know the

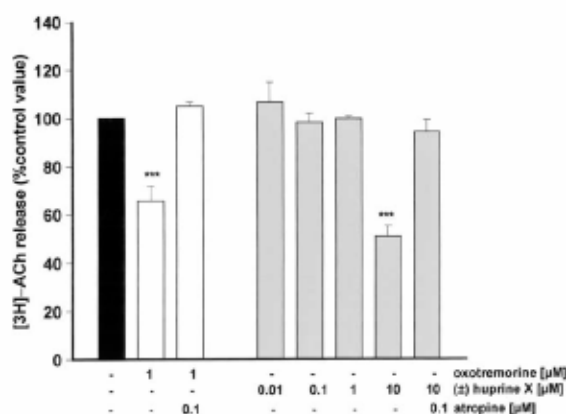


Fig. 2. Effect of oxotremorine (white columns) and (\pm)huprine X (gray columns) on evoked- $[^3H]ACh$ release in rat striatum synaptosomes (details in text). Black column represents the control values. Results were expressed as a percentage of the control group. Data are the means \pm SEM of at least four experiments run in quadruplicate. Statistical evaluation was performed by the Student's *t*-test. *** $P < 0.001$ versus control group.

potential agonist/antagonist activity of (\pm)huprine X on M_1 receptors, isolated dopaminergic nerve terminals were used in the functional studies. (\pm)Huprine X significantly (90%, $P < 0.001$) increased the $[^3H]DA$ release but only at the highest concentration tested (1 μ M). The fact that atropine reverted 30% of the increased- $[^3H]DA$ release suggests that, in addition to an agonistic effect on M_1 receptors, (\pm)huprine X is able to induce $[^3H]DA$ release through other presynaptic mechanisms. The presence of nicotinic receptors in presynaptic dopaminergic membranes has been described [18,19]. MEC, a nicotinic receptor antagonist, decreased the induced- $[^3H]DA$ release by (\pm)huprine X by 18% ($P < 0.01$). These results indicate that (\pm)huprine X can also interact with nicotinic receptors as an agonist. A more detailed study on the effect of (\pm)huprine X on nicotinic receptors is being developed in our laboratory. The concomitant presence of both muscarinic and nicotinic receptor antagonists blocked the effect of (\pm)huprine X by 60%. Due to the fact that, in our experimental approach, the interaction of other neurotransmitters present in the preparation with presynaptic membrane is avoided, other effects different from cholinergic ones on $[^3H]DA$ release are induced by this AChEI.

(\pm)Huprine X also showed an agonistic effect on M_2 receptors. A decrease of 49% ($P < 0.001$) in evoked- $[^3H]ACh$ release was obtained at 10 μ M. This effect was completely blocked by atropine. In the present study, a close correlation between binding and functional approaches has been found. Similar to the results obtained in the binding studies, a greater concentration than that needed to stimulate the M_1 receptor was necessary to activate presynaptic M_2 receptors. Taking into account that stimulation of M_2 receptors implies a decrease in $[^3H]ACh$ release, the greater affinity of drugs to M_1 receptors could represent an advantage since, in addition to its anticholinesteratic action, (\pm)huprine X could stimulate the central cholinergic system via M_1 receptors. It is worth noting that stimulation of M_1 receptors increases the release of APPs and, consequently, decreases β AP formation [7].

In summary, the (\pm)huprine X cholinesterase inhibitor interacts with muscarinic receptors showing an agonistic activity. Moreover, a nicotinic agonist effect has also been observed. This ample cholinergic profile suggests that (\pm)huprine X could be a very useful tool as a cholinergic replacement therapy in AD.

This study was supported by CICYT (project SAF99-0088). The authors would like to thank Mr Chuck Simmons, a university English instructor, for the revision and correction of the English of this article.

- [1] Badia, A., Baños, J.E. and Camps, P., Synthesis and evaluation of tacrine–huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.*, 6 (1998) 427–440.
- [2] Bai, D.L., Tang, X.C. and He, X.C., Huperzine A a potential

- therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease, *Curr. Med. Chem.*, 7 (2000) 355–374.
- [3] Bartus, R.R., Dean, R.L., Beer, B. and Lippa, A.S., The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science*, 217 (1982) 408–414.
- [4] Camps, P., El Achab, R., Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Badia, A., Baños, J.E., Vivas, N.M., Barril, X., Orozco, M. and Luque, F.J., New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.*, 43 (2000) 4657–4666.
- [5] Cutler, N.R. and Sramek, J.J., The potential of muscarinic M_1 agonists in the treatment of Alzheimer's disease, *CNS Drugs*, 3 (1995) 467–481.
- [6] De Klippel, N., Sarre, S., Ebinger, G. and Michotte, Y., Effect of M_1 - and M_2 -muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism: an in vivo microdialysis study comparing normal and 6-hydroxy-dopamine-lesioned rats, *Brain Res.*, 630 (1993) 57–64.
- [7] Eckols, K. and Bymaster, F.P., The muscarinic M_1 agonist xanomeline increases soluble amyloid precursor protein release from Chinese hamster ovary m1 cells, *Life Sci.*, 57 (1995) 1183–1190.
- [8] Flynn, D.D., Ferrari-DiLeo, G., Mash, D.C. and Levey, A.I., Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, 64 (1995) 1888–1891.
- [9] Garcia Sanz, A., Badia, A. and Clos, M.V., Superfusion of synaptosomes to study presynaptic mechanisms involved in neurotransmitter release from rat brain, *Brain Res. Protoc.*, 7 (2001) 94–102.
- [10] Giacobini, E., New trends in cholinergic therapy for Alzheimer's disease: nicotinic agonists or cholinesterase inhibitors? *Prog. Brain Res.*, 109 (1996) 311–323.
- [11] James, M.K. and Cubeddu, L.X., Pharmacologic characterization and functional role of muscarinic autoreceptors in rabbit striatum, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 240 (1987) 203–215.
- [12] Korczyn, A.D., Muscarinic M_1 agonists in the treatment of Alzheimer's disease, *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 9 (2000) 2259–2267.
- [13] Krall, W.J., Sramek, J.J. and Cutler, N.R., Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Ann. Pharmacother.*, 33 (1999) 441–450.
- [14] Lockhart, B., Closier, M., Howard, K., Steward, C. and Lestage, P., Differential inhibition of [3 H]-oxotremorine-M and [3 H]-quinuclidinyl benzylate binding to muscarinic receptors in rat brain membranes with acetylcholinesterase inhibitors, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 363 (2001) 429–438.
- [15] Mash, D.C., Flynn, D.D. and Poter, L.T., Loss of M_1 muscarinic receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation, *Science*, 228 (1985) 1115–1117.
- [16] Munson, P.J. and Rodbard, D., Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems, *Anal. Biochem.*, 107 (1980) 220–239.
- [17] Raiteri, M., Angelini, F. and Levi, G., A simple apparatus for studying the release of neurotransmitters from synaptosomes, *Eur. J. Pharmacol.*, 25 (1974) 411–414.
- [18] Rapier, C., Lunt, G.G. and Wonnacott, S., Nicotinic modulation of [3 H]dopamine release from striatal synaptosomes: pharmacological characterisation, *J. Neurochem.*, 50 (1990) 1123–1130.
- [19] Rowell, P.P., Nanomolar concentrations of nicotine increase the release of [3 H]dopamine from rat striatal synaptosomes, *Neurosci. Lett.*, 189 (1995) 171–175.
- [20] Svensson, A.L., Zhang, X. and Nordberg, A., Biphasic effect of tacrine on acetylcholine release in rat brain via M_1 and M_2 receptors, *Brain Res.*, 876 (1996) 207–212.

Research Report

Nicotinic-receptor potentiator drugs, huprine X and galantamine, increase ACh release by blocking AChE activity but not acting on nicotinic receptors

S. Roman^a, A. Badia^a, P. Camps^b, D. Muñoz-Torrero^b, M.V. Clos^{a,*}

^aDepartament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Neurociències Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain

^bLaboratori de Química Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028-Barcelona, Spain

Accepted 21 July 2005

Available online 24 October 2005

Abstract

The main goal of the present study was to analyse the effects of (±)-huprine X ((±)-HX) and galantamine (GAL), with potentiating action on nicotinic receptors, and huperzine A (HPA), devoid of nicotinic activity, on [³H]-acetylcholine ([³H]-ACh) release in striatal slices of rat brain. All compounds are non-covalent and reversible inhibitors of AChE. Addition of (±)-HX (0.01 μM), GAL (10 μM) and HPA (0.1 μM) to the superfusion medium decreased the release of the ACh neurotransmitter to a similar extent: 36%, 30% and 34%, respectively ($P < 0.01$). This effect was reverted in the presence of atropine (ATR; 0.1 μM), which blocks the pre-synaptic muscarinic M₂ receptor. After that, a wide range of concentrations of drugs, concomitantly with ATR (0.1 μM), was studied in the presence of haloperidol (HAL; 0.01 μM), a dopamine D₂ antagonist. In these conditions, a dose-dependent increase of [³H]-ACh release was observed in the presence of (±)-HX, GAL and HPA. To test the role of nicotinic receptors in the drugs' effects on [³H]-ACh release, mecamylamine (MEC) 100 μM was used to block such receptors. MEC alone significantly decreased neurotransmitter release by 18% ($P < 0.05$), but no change was obtained in the presence of both ATR and MEC. Under these conditions, (±)-HX, GAL and HPA increased the release of [³H]-ACh by 37%, 25% and 38%, respectively ($P < 0.01$). Taking into account all of these data, the present results suggest that the effects induced by (±)-HX and GAL nicotinic-receptor potentiators seem to be mainly due to their ability in inhibiting acetylcholinesterase activity, but not by interaction on the nicotinic receptors.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Theme: Neurotransmitters, modulators, transporters, and receptors

Topic: Acetylcholine receptors: nicotinic

Keywords: Galantamine; Huprine X; Acetylcholinesterase inhibitor; Nicotinic receptor

1. Introduction

In the central nervous system, ACh plays an important role as a modulator of different processes (cognition, development, synaptic plasticity) acting through nicotinic and muscarinic receptors. Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disease with

different cognitive and neuropsychiatric manifestations, and symptoms have been directly linked to dysfunctions in the central cholinergic system. Damage to cholinergic pathways in several brain regions (hippocampus and basal forebrain) and a significant decrease of ACh and choline acetyltransferase (CAT) have been extensively described [5]. In addition, ACh receptors (muscarinic and nicotinic) are also affected, diminished in number or with their functions abolished [3,8,42], concluding in a total degradation of intellectual and mental activities [7]. Thus, the cholinergic hypothesis [23,24,45] has served as the basis for the

* Corresponding author. Fax: +34 935812986.

E-mail address: victoria.clos@uab.es (M.V. Clos).

majority of treatment strategies and drug development approaches for AD to date.

Recently, a new group of AChE inhibitors, tacrine-huperzine A hybrids, the so-called huperines, has been synthesised. These drugs show high selectivity and potent inhibitory action on AChE in both *in vitro* and *ex vivo* studies [4,11,36], and it has been clearly demonstrated that they are more potent as AChE inhibitors than their parent compounds [2]. So, (\pm)-HX showed an IC_{50} value on bovine and human AChE in a low nM range, while its activity on human butyrylcholinesterase (BChE) was approximately more than 100 times lower than on AChE [10]. Moreover, recent data have demonstrated that (\pm)-HX has an agonistic action on muscarinic receptors, especially on the muscarinic M_1 receptor subtype [38].

To date, only a few AChE inhibitors, such as tacrine (Cognex[®], the first approved drug in this class but rarely prescribed today), donepezil (Aricept[®]), rivastigmine (Exelon[®]) and galantamine (Reminyl[®]) have been approved by the FDA specifically to treat AD patients with mild to moderate–severe symptoms [20]. The main purpose of these compounds is to improve the cognitive deficit through blocking the ACh hydrolysis, thus promoting the cholinergic function [14]. Nevertheless, it has been shown that the clinical potency of some AChE inhibitors does not correlate well with their ability to inhibit AChE [47]. Thus, most of them have shown some activity on acetylcholine receptors directly [29,35,40] or through an allosteric action [37]. In this sense, it has been suggested that the effectiveness of GAL in AD treatment could be related to its allosteric interaction with nicotinic receptors [3,31,36].

Previous studies developed in our lab have demonstrated that (\pm)-HX, like GAL, shows a potentiation effect on ACh release in isolated cholinergic nerve terminals by interacting with nicotinic receptors [39,41]. Nevertheless, experimental approaches used to study the potentiation activity of AChE inhibitors on nicotinic receptors (cell cultures or synaptosomal superfusion) do not take into account that other neurotransmitters present in the synaptic environment can affect the cholinergic transmission and, consequently, modify the cholinergic response to these drugs. Thus, the aim of the present experiments was to analyse the effect of (\pm)-HX and GAL (with potentiation activity on nicotinic receptors) on ACh release, using a slice-superfusion method, and to compare their effects with those of huperzine A (HPA), devoid of nicotinic activity [17,22]. This experimental approach allows us to study the modulating effect of (\pm)-HX, GAL and HPA on [³H]-ACh release in a more integrated environment and, consequently, to analyse the different components involved in this process. Data obtained in the present study show that all drugs have a similar ability in modulating ACh release, and this effect seems to be mediated by an inhibition of AChE, and not by activation of nicotinic receptors.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult Sprague–Dawley rats (3–4 months) were housed 3 per cage and maintained on a 12 h light/dark cycle with food and water freely available. Animals were killed by decapitation and the brains were quickly removed and kept on ice during dissection.

2.2. Preparation of brain slices

The striatum was dissected and cut sagittally, 400- μ m-thick slices, using a McIlwain tissue chopper. Slices were incubated at 37 °C with [³H]-choline (0.03 μ M, 81 Ci/mmol) for 20 min in 5 ml of a standard medium. The standard medium had the following composition (in mM): NaCl, 125; KCl, 3; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 1.2; NaHCO₃, 22; NaH₂PO₄, 1, glucose 10, pH 7.2 to 7.4, and continuously aerated with 95% O₂ and 5% CO₂.

2.3. Superfusion protocol

After washing with the standard medium, one slice was transferred into each of 12 parallel superfusion chambers equipped with platinum electrodes and superfused at a rate of 1 ml/min with the standard medium (37 °C) [16,33]. After 40 min of an equilibration period, 4-min superfused samples were collected during a total of 76 min. Two 2-min periods of electrical stimulation were applied at min 2 (S1) and at min 66 (S2) of superfusion (24 mA, 0.2 Hz, 2 ms), using a bipolar pulse mode. Antagonist and acetylcholinesterase inhibitor (AChEI) drugs were added to the superfusion medium 50 min and 42 min before S2, respectively. A control group with no drug was assayed in parallel. At the end of the experiment, each slice was solubilised in 0.5 ml of Soluene 350. The radioactivity content in 1 ml aliquots of the superfused samples and in the solubilised tissues was counted by liquid scintillation spectrometry (1209 Rack Beta; Wallac Oy; Finland).

The radioactivity collected in each fraction was calculated as a percentage of the total radioactivity present at the start of each fraction considered. The [³H]-ACh overflow was estimated by subtracting the basal [³H]-ACh release collected before and after the stimulating period from the stimulated fraction (S). To quantify the changes in the evoked overflow induced by drugs, ratios were calculated between the tritium overflow evoked by S2 and that evoked by S1 (S2/S1) and compared with the corresponding ratio obtained under control conditions [33].

2.4. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Variance of groups was compared using one-way ANOVA followed by

Dunnnett's multiple comparison tests where appropriate. The Student's *t* test followed by Bonferroni's test was used to compare selected groups. $P < 0.05$ was the threshold for statistical significance.

2.5. Drugs

The following drugs were used: [^3H]-choline (81 Ci mmol $^{-1}$) was obtained from Amersham International; galantamine, acetylcholine chloride, atropine, mecamlamine and haloperidol from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). (\pm)-12-amine-3-chloro-9-ethyl-6,7,10,11-tetrahydro-7,11-methanecycloocta[b]quinoline hydrochloride [(\pm)-huprine X] and huperzine A were obtained from the Laboratori de Química Farmacèutica (Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona).

The protocol described above was approved by the Animals Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona and complies with the current laws of Spain, which are in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). All efforts were made to minimise animal suffering and to reduce the number of animals used.

3. Results

Tritium released after incubation of striatal tissue with [^3H]-choline has been demonstrated to represent [^3H]-ACh during basal and stimulating conditions [19]. In the absence of added drugs, the tritium-released ratio between two stimulation periods (S2/S1) was 0.83 ± 0.12 .

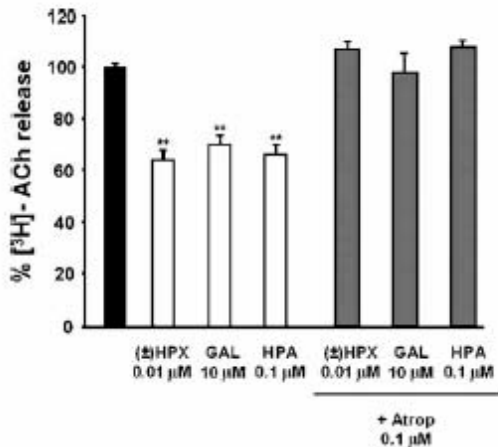


Fig. 1. Effects of (\pm)-huprine X [(\pm)-HX, 0.01 μM] galantamine (GAL, 10 μM) and huperzine A (HPA, 0.1 μM) on electrically stimulated [^3H]-ACh release in the presence and absence of atropine (ATR, 0.1 μM) in rat striatal slices. Results were expressed as a percentage of the control group (black column) and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed by the one-way ANOVA followed by Dunnnett's test (** $P < 0.001$).

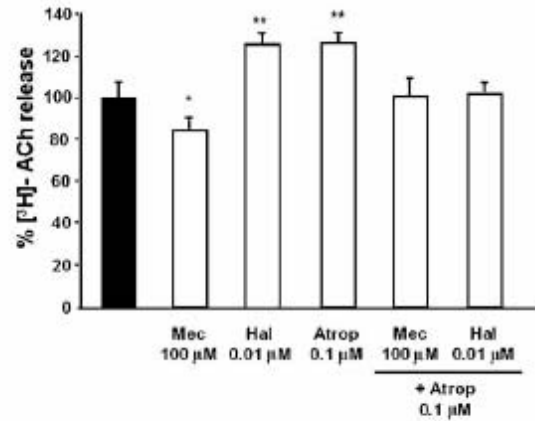


Fig. 2. Effects of different antagonists, atropine (ATR, 0.1 μM), mecamlamine (MEC, 100 μM) and haloperidol (HAL, 0.01 μM) on electrically stimulated [^3H]-ACh release in rat striatal slices. Results were expressed as a percentage of the control group (black column) and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed by the one-way ANOVA followed by Dunnnett's test (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

3.1. Effects of (\pm)-huprine X, galantamine and huperzine A, on [^3H]-ACh overflow

The effects of (\pm)-HX (0.01 μM), GAL (10 μM) and HPA (0.1 μM) on [^3H]-ACh release were determined in perfused slices from rat striatum. The AChE inhibitor concentrations used were close to IC_{50} values previously described for each drug [4,44]. Under these conditions, (\pm)-HX, GAL and HPA showed a significant decrease of [^3H]-ACh release at similar percentage values when compared with the control group (36%, 30% and 34%, respectively; $P < 0.01$) (Fig. 1).

3.2. Effects of (\pm)-huprine X, galantamine and huperzine A on [^3H]-ACh overflow in the presence of atropine 0.1 μM

To analyse the nicotinic effect of (\pm)-HX, GAL and HPA the next set of experiments was performed in the presence of ATR 0.1 μM to prevent the activation of muscarinic M_2 receptors. Previously, the effect of atropine was tested in the absence of drugs. Under these conditions, ATR significantly increased the overflow of [^3H]-ACh (24%; $P < 0.01$) over the control value (Fig. 2). The effects of (\pm)-HX, GAL and HPA were analysed in a wide range of concentrations (0.001–100 μM), nevertheless, it was not possible to test 100 μM of (\pm)-HX because of technical problems with drug solubility. In this set of experiments the ATR group was used as the control group. Although a slight increase of [^3H]-ACh overflow could be observed in the presence of higher concentrations of HPA and GAL, it was not statistically significant (Fig. 3). Like HPA and GAL, (\pm)-HX did not modify the release of [^3H]-ACh at low drug concentrations; however, a significant decrease (20%; $P < 0.05$)

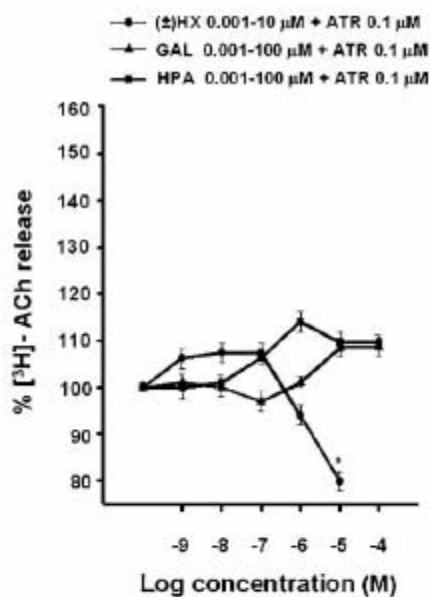


Fig. 3. Effects of (\pm)-huprine X [(\pm)-HX, 0.001–10 μ M], galantamine (GAL, 0.001–100 μ M) and huperzine A (HPA, 0.001–100 μ M) in the presence of atropine (ATR, 0.1 μ M) on electrically stimulated [3 H]-ACh release in rat striatal slices. Results were expressed as a percentage of the control group, and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed on selected data using Student's *t* test followed by Bonferroni's test ($*P < 0.05$ including Bonferroni's test correction).

was observed at the highest concentration used (10 μ M) (Fig. 3).

3.3. Effects of (\pm)-huprine X, galantamine and huperzine A on [3 H]-ACh overflow in the presence of haloperidol 0.01 μ M

Owing to the influence of dopamine D₂ receptors on ACh release [9,15], and the fact that dopamine release is under muscarinic and nicotinic receptor modulation [12,25,43], the effects of (\pm)-HX, GAL and HPA were analysed in the presence of HAL 0.01 μ M, a dopamine D₂ receptor antagonist. Previously, the effect of HAL (0.01 μ M) was tested alone and in the presence of ATR 0.1 μ M. Fig. 2 shows the effect of the dopamine D₂ antagonist HAL on [3 H]-ACh overflow. HAL did not modify the neurotransmitter release, either alone or in the presence of ATR. When the effect of these drugs was studied under these conditions, (\pm)-HX, GAL and HPA significantly increased tritium release. Fig. 4 shows that at higher drug concentrations (\pm)-HX and HPA increased the overflow of [3 H]-ACh by 49% and 51%, respectively, ($P < 0.01$). GAL also increased tritium release (30%; $P < 0.01$), but by a lower percentage than (\pm)-HX and HPA. The differences of the increases observed between galantamine versus (\pm)-HX or HPA were statistically significant at the highest concentrations of the drugs ($P < 0.01$).

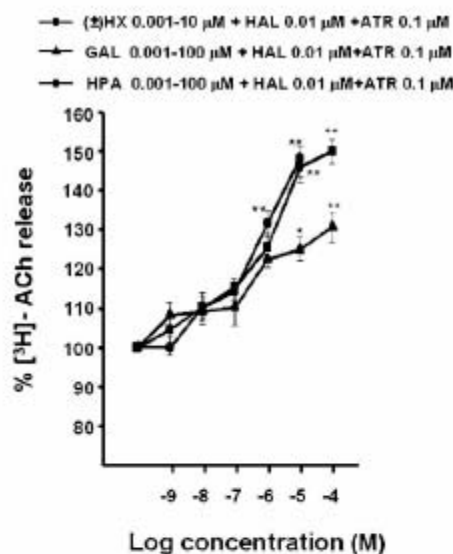


Fig. 4. Effects of (\pm)-huprine X [(\pm)-HX, 0.001–10 μ M], galantamine (GAL, 0.001–100 μ M) and huperzine A (HPA, 0.001–100 μ M) in the presence of atropine (ATR, 0.1 μ M) and haloperidol (HAL, 0.01 μ M) on electrically stimulated [3 H]-ACh release in rat striatal slices. Results were expressed as a percentage of the control group, and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed on selected data using Student's *t* test followed by Bonferroni's test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ including Bonferroni's test correction).

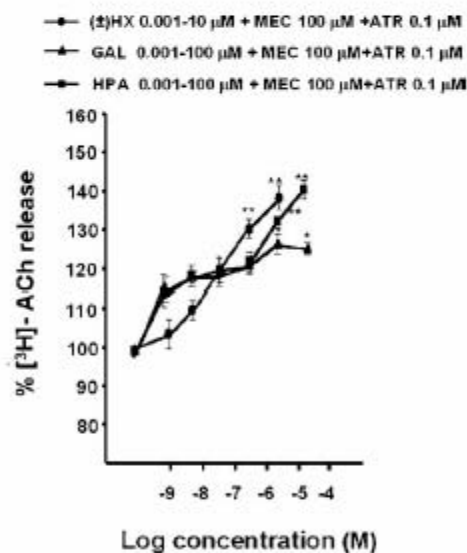


Fig. 5. Effects of (\pm)-huprine X [(\pm)-HX, 0.001–10 μ M], galantamine (GAL, 0.001–100 μ M) and huperzine A (HPA, 0.001–100 μ M) in the presence of atropine (ATR, 0.1 μ M) and mecamylamine (MEC, 100 μ M) on electrically stimulated [3 H]-ACh release in rat striatal slices. Results were expressed as a percentage of the control group, and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed on selected data using Student's *t* test followed by Bonferroni's test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ including Bonferroni's test correction).

3.4. Effects of (\pm)-huprine X, galantamine and huperzine A on [3 H]-ACh overflow in the presence of mecamylamine 100 μ M

Since (\pm)-HX and GAL are able to potentiate the nicotinic receptor activity, the effect of the drugs was also analysed in the presence of the MEC nicotinic receptor antagonist. Firstly, the effect of MEC 100 μ M was analysed alone and in the presence of ATR 0.1 μ M. As can be observed in Fig. 2, MEC itself decreased [3 H]-ACh release (18%; $P < 0.05$), however, this effect was compensated for in the presence of ATR.

In the presence of both ATR (0.1 μ M) and MEC (100 μ M), (\pm)-HX (0.001–10 μ M), GAL (0.001–100 μ M) and HPA (0.001–100 μ M) significantly increased the tritium overflow at the highest concentrations of drugs: 37%, 25%, 38%, respectively ($P < 0.01$) (Fig. 5).

4. Discussion

Different studies have demonstrated that some AChE inhibitors, like GAL, are able to potentiate nicotinic receptor activity [30], and it has been suggested that clinical effectiveness of these drugs in AD treatment could be partially due to their interaction with the nicotinic receptor [1,3,31,36]. Nevertheless, experimental approaches used to demonstrate the effects of nicotinic-receptor potentiator drugs like GAL and (\pm)-HX on such receptors have been developed using cell cultures [37] or isolated nerve terminals [39] where interactions with other neurotransmitters are completely prevented. Therefore, the nicotinic receptor potentiation induced by (\pm)-HX and GAL could be modified by different neurotransmitters and neuro-modulators present in the synaptic environment. In fact, the results obtained in the present experiments suggest that, in rat striatal slices, (\pm)-HX and GAL increase the [3 H]-ACh overflow only in the presence of muscarinic-, dopaminic- or nicotinic-receptor antagonists. Consequently, this increase of [3 H]-ACh seems to be mediated by the ability of drugs to inhibit AChE activity.

AChEI (\pm)-HX, GAL and HPA used at concentrations close to IC50 decreased [3 H]-ACh overflow to a similar extent by 36%, 30% and 34%, respectively ($P < 0.01$). This is consistent with previous data reported by several authors where the effects of different AChE inhibitors on [3 H]-ACh release in brain slices were analysed. [17,18,28]. The inhibition of AChE by the drugs increases the levels of ACh in the synaptic cleft and, in turn, ACh interacts with presynaptic muscarinic M₂ receptors inhibiting its own release. Consequently, the effect of (\pm)-HX, GAL and HPA on nicotinic receptors was studied in the presence of ATR 0.1 μ M to prevent the interaction of ACh on muscarinic receptors. The only addition of ATR to the superfusion medium, which resulted in a blockage of muscarinic M₂ receptor activity, induced the consequent enhancement of

[3 H]-ACh release (25%; $P < 0.01$) [32,33,46]. When the effects of a wide range of drug concentrations were analysed under these conditions, (\pm)-HX (0.001–10 μ M), GAL (0.001–100 μ M) and HPA (0.001–100 μ M), no modification was observed on the [3 H]-ACh release. However, at the highest concentration of (\pm)-HX (10 μ M), [3 H]-ACh release decreased by 20% ($P < 0.05$). In contrast, it has been previously described that (\pm)-HX at 10 μ M of concentration increases [3 H]-ACh release through nicotinic receptors after blocking M₂ receptors in rat cortical synaptosomes [39]. In the present experimental approach, when (\pm)-HX is added to the superfusion medium, AChE is inhibited, thus increasing the ACh levels in the synaptic cleft. Moreover, due to its agonist M₂ receptor effect, (\pm)-HX could displace ATR from the presynaptic M₂ receptor, thus inducing a decrease in [3 H]-ACh release. This decrease was not observed using GAL and HPA since neither GAL nor HPA interacts with muscarinic receptors [21,22,41].

As has been stated in the Introduction, (\pm)-HX and GAL show a potentiation effect on nicotinic receptors in addition to their inhibitory effect on AChE [30,39,41], while HPA is devoid of this effect [22]. So, after blocking muscarinic M₂ receptors with ATR, an increase in [3 H]-ACh release in the presence of (\pm)-HX and GAL was expected. Nevertheless, the tritium overflow values remained unchanged. It is well documented that ACh release is submitted to a tonic inhibitory influence by dopamine D₂ hetero-receptors in several brain regions [6,9,27]. Moreover, muscarinic M₁ receptors and nicotinic receptors are expressed in dopaminergic neurons and the activation of both receptors increases the release of dopamine [13,26,34,48]. In the present experiments, where muscarinic receptors were blocked by ATR, activation of nicotinic receptors in dopaminergic nerve terminals by (\pm)-HX and GAL (directly or by blocking AChE) would increase the release of dopamine, which in turn could interact with dopamine D₂ receptors on cholinergic nerve terminals, thus decreasing [3 H]-ACh release. Consequently, an increase in [3 H]-ACh release could be observed after blocking either dopamine D₂ receptors or nicotinic receptors.

Therefore, in the following set of experiments the effects of AChE inhibitors were analysed in the concomitant presence of HAL (0.01 μ M), a dopamine D₂ receptor antagonist and ATR (0.1 μ M). According to previous reports [46], HAL did not modify the [3 H]-ACh overflow either in the presence or absence of ATR. Under these conditions, all drugs tested significantly increased the [3 H]-ACh overflow in a concentration-dependent manner, and this increase was more noteworthy at the highest drug concentrations: (\pm)-HX (49%), GAL (30%) and HPA (51%). The fact that HPA is devoid of nicotinic activity, but in this study increased the release of [3 H]-ACh, suggests that this increase is probably due to an enhancement of the neurotransmitter through the inhibitory action of drugs on AChE. Nevertheless, taking into account that (\pm)-HX and GAL have a potentiating effect

on nicotinic receptors, an interaction of (\pm)-HX and GAL on such receptors cannot be ruled out.

To test whether nicotinic receptors could be involved, at least partially, in the increase of [3 H]-ACh release induced by (\pm)-HX and GAL, experiments were next developed in the presence of MEC, a nicotinic receptor antagonist. According to previous studies [33], after blocking nicotinic receptors with MEC, the [3 H]-ACh release significantly decreased (18%; $P < 0.05$), notwithstanding, in the presence of both ATR and MEC the release remained unchanged. Under these conditions all AChE inhibitors increased [3 H]-ACh overflow, especially at higher concentrations of drugs, with a similar response-profile to that observed in the presence of HAL [(\pm)-HX 37%, GAL 25% and HPA 38%]. Thus, these results suggest that, in the present experimental conditions, the effects of AChE inhibitors on [3 H]-ACh release are only due to their ability in inhibiting the enzyme. In fact, GAL, which shows the lowest [3 H]-ACh increase, is the least potent inhibitor included in this study [4].

Acknowledgments

This work was supported by DGICYT (SAF2002-00049) and CIRIT (2001SGR00216). The English of the manuscript has been revised and corrected by a native English-speaking English Instructor of this University.

References

- [1] E.X. Albuquerque, E.F. Pereira, Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance, *Behav. Brain Res.* 113 (2000) 131–141.
- [2] M.M. Alcalá, N.M. Vivas, S. Hospital, P. Camps, D. Muñoz-Torrero, A. Badia, Characterisation of the anticholinesterase activity of two new tacrine-huperzine A hybrids, *Neuropharmacology* 44 (2003) 749–755.
- [3] G. Arroyo, M. Aldea, J. Fuentelba, A.G. Garcia, Nicotinic receptor, galantamine and Alzheimer disease, *Rev. Neurol.* 34 (2002) 1057–1065.
- [4] A. Badia, J.E. Baños, P. Camps, Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998) 427–440.
- [5] R.T. Bartus, R.L. Dean, B. Beer, A.S. Lippa, The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science* 217 (1984) 408–417.
- [6] P. Baud, S. Arbilla, S.Z. Langer, Inhibition of the electrically evoked release of [3 H]acetylcholine in rat striatal slices: an experimental model for drugs that enhance dopaminergic neurotransmission, *J. Neurochem.* 44 (1985) 331–337.
- [7] G. Benzi, A. Moretti, Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur. J. Pharmacol.* 346 (1998) 1–13.
- [8] N.J.M. Birdsall, N.M. Nathanson, R.D. Schwarz, Muscarinic receptors: it's a knockout, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 215–219.
- [9] J.R. Bloomquist, R.L. Barlow, J.S. Gillette, W. Li, M.L. Kirby, Selective effects of insecticides on nigrostriatal dopaminergic nerve pathways, *Neurotoxicology* 23 (2002) 537–544.
- [10] P. Camps, B. Cusack, W.D. Mallender, R.E. El Achab, J. Morral, D. Muñoz-Torrero, T.L. Rosenberry, Huperzine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 409–417.
- [11] P. Camps, R. El Achab, J. Morral, D. Muñoz-Torrero, A. Badia, J.E. Baños, N.M. Vivas, X. Barril, M. Orozco, F.J. Luque, New tacrine-huperzine A hybrids (huperines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 4657–4666.
- [12] N. Champiaux, C. Gotti, M. Cordero-Erasquin, D.J. David, C. Przybylski, C. Lena, F. Clementi, M. Moretti, F.M. Rossi, N. Le Novere, J.M. McIntosh, A.M. Gardier, J.P. Changeux, Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice, *J. Neurosci.* 23 (2003) 7820–7829.
- [13] Y. Chen, T.J. Sharples, K.G. Phillips, G. Benedetti, L.M. Broad, R. Zwart, E. Sher, The nicotinic alpha 4 beta 2 receptor selective agonist, TC-2559, increases dopamine neuronal activity in the ventral tegmental area of rat midbrain slices, *Neuropharmacology* 45 (2003) 334–344.
- [14] M. Cobo, I. Exposito, F. Mora, Aging, prefrontal cortex, and amino acid neurotransmitters: differential effects produced by electrical stimulation, *Neurobiol. Aging* 14 (1993) 187–190.
- [15] P. DeBoer, E.D. Abercrombie, Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277 (1996) 775–783.
- [16] V. Dolezal, R. Jackisch, G. Herting, C. Allgaier, Activation of dopamine D₁ receptors does not affect D₂ receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in rabbit striatum, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 345 (1992) 16–20.
- [17] D. Fayuk, J.L. Yakel, Regulation of nicotinic acetylcholine receptor channel function by acetylcholinesterase inhibitors in rat hippocampal CA1 interneurons, *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 658–666.
- [18] T.J. Feuerstein, J. Lehmann, W. Sauermann, V. van Velthoven, R. Jackisch, The autoinhibitory feedback control of acetylcholine release in human cortex tissue, *Brain Res.* 572 (1992) 64–71.
- [19] H. Fujiwara, N. Kato, H. Shuntoh, C. Tanaka, D₂-dopamine receptor-mediated inhibition of intracellular Ca²⁺ mobilization and release of acetylcholine guinea-pig neostriatal slices, *Br. J. Pharmacol.* 287 (1987) 297.
- [20] A.F. García, P. Barreiro Tella, E. Díez Tejedor, Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Alzheimer, *Farmacoterapia XV* (5) (1998) 231–239.
- [21] H. Geerts, L. Finkel, R. Carr, A. Spiros, Nicotinic receptors modulation: advantages for successful Alzheimer's disease therapy, *J. Neural Transm., Suppl.* (2002) 203–216.
- [22] R.K. Gordon, S.V. Nigam, J.A. Weitz, J.R. Dave, B.P. Doctor, H.S. Ved, The NMDA receptor ion channel: a site for binding of Huperzine A, *J. Appl. Toxicol.* 21 (Suppl. 1) (2001) S47–S51.
- [23] D.B. Hogan, C. Paterson, Progress in clinical neuroscience: treatment of Alzheimer's disease and other dementias—Review and comparison of the cholinesterase inhibitors, *Can. J. Neurol. Sci.* 29 (2002) 306–314.
- [24] R.W. Jones, Have cholinergic therapies reached their clinical boundary in Alzheimer's disease? *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 18 (2003) S7–S13.
- [25] I.W. Jones, J.P. Bolam, S. Wonnacott, Presynaptic localisation of the nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit immunoreactivity in rat nigrostriatal dopaminergic neurones, *J. Comp. Neurol.* 439 (2001) 235–247.
- [26] S.A. Kaiser, L. Soliakov, S.C. Harvey, C.W. Luetje, S. Wonnacott, Differential inhibition by alpha-conotoxin-MII of the nicotinic stimulation of [3 H]dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices, *J. Neurochem.* 70 (1998) 1069–1076.
- [27] F. Laplanté, L.K. Srivastava, R. Quirion, Alterations in dopaminergic modulation of prefrontal cortical acetylcholine release in post-pubertal rats with neonatal ventral hippocampal lesions, *J. Neurochem.* 89 (2004) 314–323.
- [28] J. Liu, T. Chakraborti, C. Pope, In vitro effects of organophosphorus anticholinesterases on muscarinic receptor-mediated inhibition of

- acetylcholine release in rat striatum, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 178 (2002) 102–108.
- [29] B. Lockhart, M. Closier, K. Howard, C. Steward, P. Lestage, Differential inhibition of [³H]-oxotremorine-M and [³H]-quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic receptors in rat brain membranes with acetylcholinesterase inhibitors, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 363 (2001) 429–438.
- [30] A. Maelicke, E.X. Albuquerque, Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease, *Eur. J. Pharmacol.* 393 (2000) 165–170.
- [31] A. Maelicke, A. Schratzenholz, E.X. Albuquerque, Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.* 113 (2000) 199–206.
- [32] M. Marchi, M. Raiteri, On presence in the cerebral cortex of muscarinic receptor subtypes which differ in neuronal localization, function and pharmacological properties, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235 (1985) 230–233.
- [33] M. Marchi, M. Raiteri, Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of "impaired" cholinergic presynaptic function, *J. Neurochem.* 67 (1996) 1974–1981.
- [34] L.S. Middleton, W.A. Cass, L.P. Dwoskin, Nicotinic receptor modulation of dopamine transporter function in rat striatum and medial prefrontal cortex, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308 (2004) 367–377.
- [35] A. Nordberg, A. Lilja, H. Lundqvist, P. Hartvig, K. Amberla, M. Viitanen, U. Warpmann, M. Johansson, E. Hellstrom-Lindahl, P. Bjurling, Tacrine restores cholinergic nicotinic receptors and glucose metabolism in Alzheimer patients as visualized by positron emission tomography, *Neurobiol. Aging* 13 (1992) 747–758.
- [36] J. Olin, L. Schneider, Galantamine for Alzheimer's disease, *Cochrane Database Syst. Rev.* 3 (2002) CD001747.
- [37] E.F. Pereira, M. Alkodon, S. Reinhart-Maelicke, A. Maelicke, X. Peng, J. Lindstrom, P. Whiting, E.X. Albuquerque, Physostigmine and galanthamine: probes for a novel binding site on the $\alpha 4\beta 2$ subtype of neural nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in fibroblast cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994) 768–778.
- [38] S. Román, N.M. Vivas, A. Badía, M.V. Clos, Interaction of a new potent anticholinesterase compound (\pm) Huprine X with muscarinic receptors in rat brain, *Neurosci. Lett.* 325 (2002) 103–106.
- [39] S. Roman, A. Badía, P. Camps, M.V. Clos, Potentiation effects of (\pm)huprine X, a new acetylcholinesterase inhibitor, on nicotinic receptors in rat cortical synaptosomes, *Neuropharmacology* 46 (2004) 95–102.
- [40] E. Ros, J. Aleu, I. Gómez de Aranda, C. Cantí, Y.P. Pang, J. Marsal, C. Solsona, Effects of bis(7)-tacrine on spontaneous synaptic activity and on the nicotinic ACh receptor of Torpedo electric organ, *J. Neurophysiol.* 86 (2001) 183–189.
- [41] M. Samochocki, A. Hoffle, A. Fehrenbacher, R. Jostock, J. Ludwig, C. Christner, M. Radina, M. Zerlin, C. Ullmer, E.F. Pereira, H. Lubbert, E.X. Albuquerque, A. Maelicke, Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 1024–1036.
- [42] B. Schroder, B. Franz, P. Hempfling, M. Selbert, T. Jurgens, H.A. Kretschmar, M. Bodemer, S. Poser, I. Zerr, Polymorphisms within the prion-like protein gene (Pnd) and their implications in human prion diseases, Alzheimer's disease and other neurological disorders, *Hum. Genet.* 109 (2001) 319–325.
- [43] I. Smolders, L. Bogaert, G. Ebinger, Y. Michotte, Muscarinic modulation of striatal dopamine, glutamate, and GABA release, as measured with in vivo microdialysis, *J. Neurochem.* 68 (1997) 1942–1948.
- [44] J.J. Sramek, E.J. Frackiewicz, N.R. Cutler, Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine, *Expert Opin. Investig. Drugs* 9 (2000) 2393–2402.
- [45] M.S. Starr, Glutamate/dopamine D_1/D_2 balance in the basal ganglia and its relevance to Parkinson's disease, *Synapse* 19 (1995) 264–293.
- [46] H.H. Wang, Y.C. Chou, J.F. Liao, C.F. Chen, Dimemorfan enhances acetylcholine release from rat hippocampal slices, *Brain Res.* 1008 (2004) 113–115.
- [47] D.G. Wilkinson, P.T. Francis, E. Schwam, J. Payne-Parrish, Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy, *Drugs Aging* 21 (2004) 453–478.
- [48] S. Wonnacott, S. Kaiser, A. Mogg, L. Soliakov, I.W. Jones, Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum, *Eur. J. Pharmacol.* 393 (2000) 51–58.

Potential effects of (±)huprine X, a new acetylcholinesterase inhibitor, on nicotinic receptors in rat cortical synaptosomes

S. Roman^a, A. Badia^a, P. Camps^b, M.V. Clos^{a,*}

^a *Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, Spain*

^b *Laboratori de Química Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

Received 13 February 2003; received in revised form 24 July 2003; accepted 8 August 2003

Abstract

The present experiments were developed to analyze the direct and/or potentiation effect of (±)-12-amino-3-chloro-9-ethyl-6,7,10,11-tetrahydro-7,11-methanocycloocta[*b*]quinoline hydrochloride ((±)huprine X) on nicotinic receptors using a synaptosomal superfusion method. (±)Huprine X (1 μM, 10 μM) increased [³H]-ACh release only at 10 μM (46%; *P* < 0.001) in basal, but not in stimulated, conditions. This effect was completely reverted by mecamylamine (100 μM; MEC). Potentiation of evoked-[³H]-ACh release induced by ACh (1 μM) and by galantamine (GAL) 0.4 μM and physostigmine (PHY) 10 μM (55% and 50%, respectively; *P* < 0.001), two well-known allosteric compounds, corroborate that the present experimental approach is a suitable method to study potentiation effects on nicotinic receptors in the central nervous system nerve terminals. (±)Huprine X potentiated the evoked-[³H]-ACh release induced by ACh (1 μM) by 166% and 90% (*P* < 0.001) at 10 μM and 30 μM, respectively, and this effect was completely blocked by MEC (100 μM). In the presence of different ACh concentrations, (±)huprine X 10 μM potentiated evoked-[³H]-ACh release at low ACh concentrations, while a decrease in neurotransmitter release was observed at high ACh concentrations. The highest potentiation effect was obtained at the ACh/(±)huprine X concentration ratio of 1:10, and this potentiation was observed at as low a (±)huprine X concentration as 0.1 μM (*P* < 0.05). While the results suggest that huprine may enhance the potency or effectiveness of ACh by an effect involving nicotinic receptors we cannot completely discard that the results could be explained by acetylcholinesterase inhibition.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nicotinic receptors; Acetylcholinesterase inhibitors; Galantamine; Physostigmine; (±)Huprine X; Synaptosomes

1. Introduction

It is well known that in Alzheimer's disease (AD), cholinergic pathways projecting from basal forebrain regions are disrupted, and neurons ultimately die in several brain regions, including the hippocampus and basal forebrain. This results in a notable decrease of acetylcholine (ACh) and choline acetyltransferase (CAT) in these brain regions. Although the acetylcholinesterase (AChE) may be affected and nicotinic receptors are diminished in AD (Schöder and Wevers, 1998; Bartus et al., 1984), controversial data exist about changes in muscarinic

receptors, (DeKosky and López, 1998; Birdsall and Nathanson, 2001).

Because of the functional impairment of cholinergic neurons, therapeutic approaches are focused on the increase in cholinergic neurotransmission. Several clinical trials have shown that acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) are the most promising drugs demonstrating efficacy in the treatment of AD. Tacrine, galantamine (GAL), rivastigmine and donepezil are some AChEIs used in the treatment of AD (Benzi and Moretti, 1998; Cheng and Tang, 1998), and several new AChEIs, such as (±)huperzine A, are being studied (Tang and Han, 1999).

There is a large body of evidence to indicate that some AChEIs can also interact with other cholinergic structures, like muscarinic (Román et al., 2002; Zhang et al., 2002) and nicotinic acetylcholine receptors (Nilsson et

* Corresponding author. Tel.: +34-935811952; fax: +34-935812986.
E-mail address: victoria.clos@uab.es (M.V. Clos).

al., 1987; Ros et al., 2001). Nicotinic cholinergic dysfunction is another leading neurochemical feature in senile dementia of the Alzheimer type. Consequently, nicotinic acetylcholine receptors have attracted considerable interest as potential therapeutic targets in AD. It has been well demonstrated that selective nicotinic agonists alleviate some cognitive deficiencies due to cholinergic neuron dysfunction and ameliorate memory deficits in human patients (Schöder and Wevers, 1998; Martín-Ruiz et al., 1999; Woodruff-Pak and Santos, 2000).

Recent data indicate that some AChEIs can increase the efficiency of cholinergic transmission by an allosterical action on nicotinic acetylcholine receptors (Schratzenholz et al., 1996; Maelicke and Albuquerque, 2000). Thus, some AChEIs like physostigmine (PHY) and GAL enhance the activity of nicotinic receptors in the presence of endogenous agonist ACh in both cultured PC12 pheochromocytoma cells (Schratzenholz et al., 1996) and hippocampal neurons (Maelicke and Albuquerque, 2000).

Recently, a new group of anticholinesterasic drugs, tacrine and (\pm)huperzine A hybrids, called huprines, has been synthesized. These drugs show high selectivity and potent inhibitory action on AChE in both in vitro and ex vivo studies (Badia et al., 1998; Camps et al., 2000). (\pm)Huprine X showed an IC_{50} value on bovine and human AChE in the nM range, while its activity on human butyrylcholinesterase (BChE) is approximately more than 100 times lower than on AChE (Camps et al., 2000). Moreover, recent data have demonstrated that (\pm)huprine X has an agonistic action on muscarinic receptors, especially on the M_1 muscarinic receptor subtype (Román et al., 2002).

Because nicotinic acetylcholine receptors are reduced in the AD and have an important role in memory and the learning process, the goal of the present experiments has been to study the possible direct and/or potentiation effects of (\pm)huprine X on nicotinic acetylcholine receptors. For this purpose, the effect of this drug on [3 H]-ACh release was studied using a synaptosomal superfusion method to avoid the possible interactions with other neurotransmitters/neuromodulators present in the physiological environment (Raiteri and Angelini, 1974; García-Sanz et al., 2001).

2. Materials and methods

2.1. Preparation of synaptosomes

Male Sprague–Dawley rats (3–4 months old) were housed 3 per cage and maintained on a 12 h light/dark cycle with food and water freely available. Animals were killed by decapitation and the brains were quickly removed and kept on ice during dissection. Crude prefrontal cortex synaptosomes were prepared according to

Gray and Whittaker (Gray and Whittaker, 1962). Briefly, the prefrontal cortex was rapidly dissected on ice and homogenized in 40 volumes of 0.32 M sucrose buffered at pH 7.4 with sodium phosphate (0.01 M). Homogenates were centrifuged at 1000 g for 5 min, the pellet was discarded and the supernatant was again centrifuged at 12,000 g for 20 min. The crude synaptosomal pellet was then resuspended in a standard medium having the following composition (in mM): NaCl 125, KCl 3, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.2, NaHCO₃ 22, NaH₂PO₄ 1, glucose 10, pH 7.2–7.4 and continuously aerated with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37 °C.

2.2. Neurotransmitter release

The release of [3 H]-ACh from synaptosomes was measured in a continuous superfusion system as described by Raiteri et al. (Raiteri and Angelini, 1974). Briefly, after incubation of the synaptosomal suspension (15 min, 37 °C) in the presence of [3 H]-choline (0.03 μ M, 81 Ci/mmol), aliquots of the synaptosomal suspension (0.24 mg/protein/chamber) were distributed on 0.65 μ m Millipore filters and placed at the bottom of a set of parallel superfusion chambers maintained at 37 °C. Superfusion was started with the standard medium aerated with 95% O₂ and 5% CO₂, at a rate of 0.65 ml/min ($t = 0$). In these conditions, neurotransmitters and neuromodulators present in the preparation (labeled and endogenous) are immediately and continuously removed, therefore, they cannot accumulate at the membrane biophase (García-Sanz et al., 2001). Consequently, using the present experimental approach it is not necessary to previously inhibit the acetylcholinesterase activity to evaluate the effects of drugs on nicotinic receptors.

Before analyzing the effects of drugs synaptosomes were superfused for 20 min to obtain a constant outflow of tritium (equilibration period). To avoid interactions of drugs on presynaptic M_2 muscarinic receptors, atropine (0.1 μ M) was present in all experiments. The direct effect of (\pm)huprine X on nicotinic receptors was studied in basal conditions (3 mM K⁺). Four 2-min fractions (F_1 – F_4) were collected starting at $t = 37.5$ min. After the beginning of superfusion, agonist drugs, (\pm)huprine X and acetylcholine were added at the end of the first fraction collected, concomitantly with standard medium.

In the potentiation studies (stimulating conditions, K⁺ 15 mM) the following consecutive fractions were collected: basal ($b_1 = 2.5$ min), stimulated ($S = 5$ min) and after-depolarization (basal; $b_2 = 2.5$ min). Synaptosomes were exposed to the depolarizing stimulus (15 mM K⁺) for 90 s starting at the end of the first fraction collected (b_1). Agonist drugs (ACh, GAL, PHY and (\pm)huprine X) were added to the superfusion medium concomitantly with the depolarizing medium. When it was necessary, the antagonist drugs were added to the superfusion

medium 8 min before the first fraction, and they were present throughout the superfusion period.

The amount of radioactivity released into each fraction was expressed as a percentage of the total synaptosomal tritium at the start of the respective collection period. To evaluate the drugs' effects on basal conditions, the F_4/F_1 ratio of drug-treated chambers was compared with that of appropriate controls assayed in parallel. This F_4/F_1 ratio was compared with the corresponding F_4/F_1 ratio obtained in control conditions. The K^+ -evoked overflow was estimated by subtracting basal release ($b_1 + b_2$) from the K^+ -evoked release (S).

The radioactivity present in the different fractions and in the filters was quantified by liquid scintillation spectrometry (1209 Rack Beta, Wallac Oy, Finland).

2.3. Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Variances of groups were compared using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test where it was appropriate. The Student's *t*-test followed by Bonferroni's test were used to compare selected groups.

2.4. Drugs

The following drugs were used: [3 H]-choline (81 Ci/mmol) was obtained from Amersham International; PHY, which was dissolved in a standard medium containing methanol ($\leq 0.01\%$), GAL, atropine, MEC and ACh chloride from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). The (\pm)-12-amino-3-chloro-9-ethyl-6,7,10,11-tetrahydro-7,11-methanocycloocta[b]quinoline hydrochloride ((\pm)Huprine X) compound was a generous donation by Dr. P. Camps from the Laboratori de Química Farmacèutica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

3. Results

All experiments performed in the present study were conducted in the presence of atropine $0.1 \mu\text{M}$ to block presynaptic muscarinic receptors and to make the nicotinic receptor activity stand out. In fact, it has been previously demonstrated that (\pm)huprine X has an agonist effect on such receptors, although it has been only observed at high drug concentrations (Román et al., 2002).

In the first fraction collected ($t = 38$ – 40 min), fractional tritium release from rat cortical synaptosomes was $2.61 \pm 0.1\%$, of the total radioactivity remaining in the first fraction in the absence of added drugs.

3.1. Nicotinic effect of (\pm)huprine X on [3 H]-acetylcholine release in prefrontal cortical synaptosomes

It is known that activation of presynaptic nicotinic receptors increases [3 H]-ACh release (Nilsson et al., 1987), and this effect seems to be more apparent under non-stimulating conditions (Marchi and Raiteri, 1996). Consequently, the effect of (\pm)huprine X on nicotinic receptors was firstly carried out under basal conditions (K^+ 3 mM). Using ACh $10 \mu\text{M}$, the release of [3 H]-ACh increased by 30% ($P < 0.01$) over the control group. When activation of nicotinic receptors was studied in the presence of (\pm)huprine X 1 and $10 \mu\text{M}$, an increase of [3 H]-ACh release was only obtained at the highest drug concentration ($10 \mu\text{M}$; 46% ; $P < 0.01$). The effects of ACh and (\pm)huprine X were reverted in the presence of MEC $100 \mu\text{M}$ (Fig. 1). Nevertheless, when the effect of (\pm)huprine X was analyzed in stimulated conditions ($15 \text{ mM } K^+$), non-significant modifications were not observed at either $1 \mu\text{M}$ or at $10 \mu\text{M}$ (tritium overflow: control group = $2.64 \pm 0.07\%$; (\pm)huprine X $1 \mu\text{M}$ = $2.67 \pm 0.13\%$; (\pm)huprine X $10 \mu\text{M}$ = $2.47 \pm 0.11\%$; $n = 5$).

3.2. Potentiation effect of anticholinesterase drugs on nicotinic receptors in prefrontal cortex synaptosomes

3.2.1. Effect of PHY and GAL on evoked- [3 H]-ACh release induced by ACh

To evaluate whether our experimental approach was an appropriate method to study the potentiation action

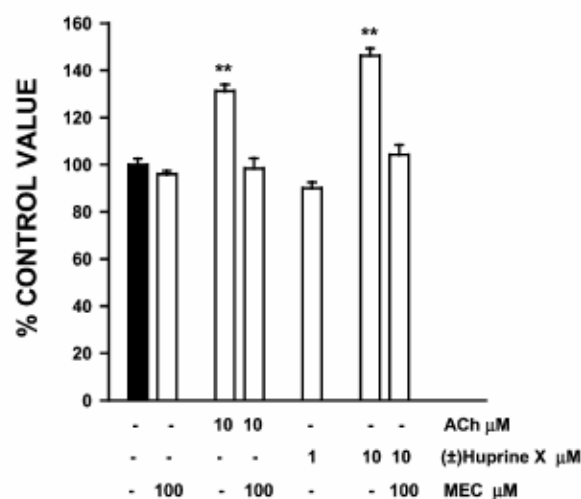


Fig. 1. Effect of ACh $1 \mu\text{M}$ and (\pm)huprine X 1 and $10 \mu\text{M}$, in the presence and in the absence of MEC $100 \mu\text{M}$, on basal release of [3 H]-ACh in rat cortical synaptosomes. Atropine $0.1 \mu\text{M}$ was present during the experiment to block muscarinic M_2 presynaptic receptors. The black column represents control values. Results were expressed as a percentage of the control group and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed by the one-way ANOVA followed by Dunnett's test (** $P < 0.01$).

of (\pm)huprine X on nicotinic receptors, we first analyzed the effects of GAL and PHY, two well-described anticholinesteratic drugs whose ability to potentiate nicotinic receptor responses through an allosteric effect has been demonstrated (Schrattenholz et al., 1996; Maelicke et al., 2000). Firstly, the experiments were conducted in basal conditions; nevertheless, no modifications on [3 H]-ACh release induced by ACh (1 μ M) were observed in the presence of anticholinesteratic drugs (b_4/b_1 : control group = 0.96 ± 0.015 ; ACh 1 μ M = 0.94 ± 0.01 ; ACh 1 μ M + GAL 0.4 μ M = 0.925 ± 0.024 ; ACh 1 μ M + PHY 10 μ M = 0.93 ± 0.025 ; $n = 3$). Consequently, the potentiation effect of GAL and PHY was studied in stimulating conditions similar to those used in electrophysiological studies (Storch et al., 1995; Schrattenholz et al., 1996; Zwart and Vijverberg, 2000). As can be observed in Fig. 2, in the absence of ACh neither PHY nor GAL modified the evoked- 3 H]-ACh release. When GAL and PHY were added to the superfusion medium in the presence of ACh 1 μ M, a strong potentiation of evoked- 3 H]-ACh release induced by ACh was obtained (55% and 50%, respectively; $P < 0.01$). The potentiation effect of GAL and PHY was abrogated in the presence of 100 μ M MEC, a nicotinic receptor antagonist (Fig. 2).

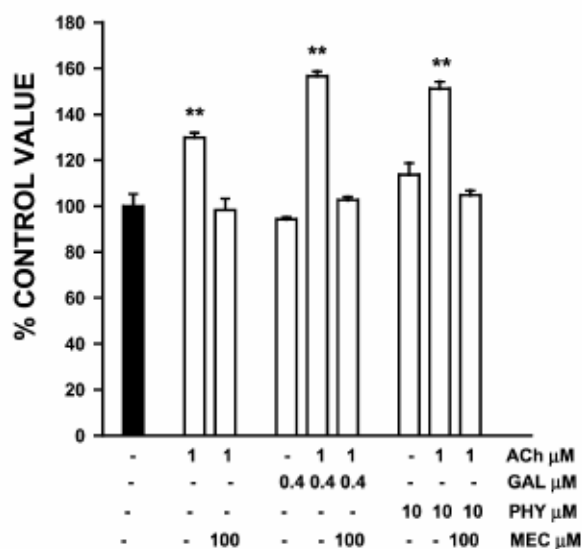


Fig. 2. Effect of ACh 1 μ M and GAL 0.4 and PHY 10 μ M, in the presence and in the absence of ACh 1 μ M, on evoked- 3 H]-ACh release on nicotinic receptors in rat cortical synaptosomes. Atropine 0.1 μ M was present during the experiment to block muscarinic M_2 presynaptic receptors. MEC 100 μ M was used to revert nicotinic effect induced by ACh, GAL and PHY. The black column represents control values. Results were expressed as a percentage of the control group and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed by the one-way ANOVA followed by Dunnett's test (** $P < 0.01$).

3.2.2. Effect of (\pm)huprine X on evoked- 3 H]-ACh release induced by ACh

After establishing that our experimental method was appropriate for studying the potentiation actions on nicotinic receptors, the effect of (\pm)huprine X was analyzed using the same experimental approach. To attain this goal, a wide range of (\pm)huprine X concentrations (0.1–30 μ M) was studied in the presence of 1 μ M ACh. In these conditions, (\pm)huprine X enhanced evoked- 3 H]-ACh release induced by ACh with a maximal effect at 10 μ M (170%; $P < 0.01$). Nevertheless, the magnitude of potentiation caused by (\pm)huprine X at the highest concentration (30 μ M) was 90% ($P < 0.01$). Technical problems with drug solubility limited the study at higher concentrations of the drug. No significant changes were observed at lower drug concentrations, i.e. 0.1 and 1 μ M (Fig. 3).

Afterwards, the effect of 10 μ M (\pm)huprine X on a wide range of ACh concentrations (0.001–30 μ M) was analyzed. As Fig. 4 shows, the concentration–response curve of ACh is “bell-shaped”, and this curve is consistent with nicotinic receptor desensitization at a high agonist (ACh) concentration. In the presence of (\pm)huprine X, the maximal potentiation effect was obtained at 1 μ M ACh (169%; $P < 0.05$) and this effect was surpassed at higher ACh concentrations (ACh ≥ 3 μ M).

Thus, at ACh 3 μ M the potentiation of (\pm)huprine X was only 49%, while an inhibitory effect on evoked- 3 H]-ACh release induced by ACh at 10 and 30 μ M was observed.

Due to the highest potentiation effect of (\pm)huprine X being observed when the concentration ratio of ACh/(\pm)huprine X was 1:10, the potentiation effect of

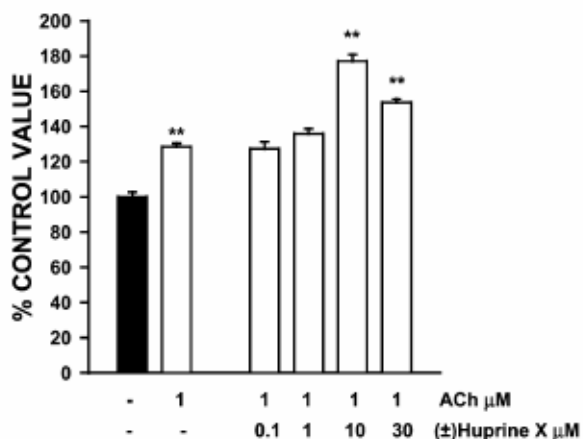


Fig. 3. Effect of (\pm)huprine X (0.1–30 μ M) in the presence of ACh 1 μ M, on evoked release of 3 H]-ACh in rat cortical synaptosomes. Atropine 0.1 μ M was present during the experiment. The black column represents the control values. Results were expressed as a percentage of the control group and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed by the one-way ANOVA followed by Dunnett's test (** $P < 0.01$).

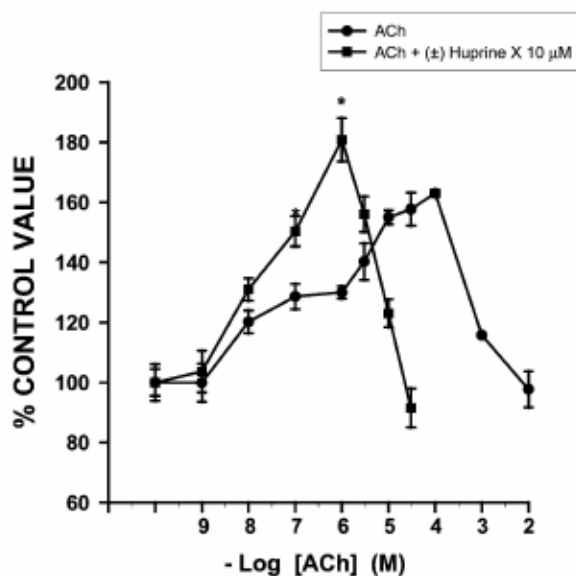


Fig. 4. Effect of ACh (0.001–1000 μM) in the presence (■) and in the absence (●) of (\pm)huprine X 10 μM , on the evoked release of [^3H]-ACh in rat cortical synaptosomes. Atropine 0.1 μM was present during the experiment to block M_2 presynaptic receptors. Results were expressed as a percentage of the control group. Data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed on selected data using Student's *t*-test followed by Bonferroni's test ($*P < 0.05$ including Bonferroni's test correction).

(\pm)huprine X using different ACh (0.0001–1 μM) and (\pm)huprine X (0.001–10 μM) concentrations (Fig. 5) was studied. In any case, the 1:10 concentration ratio was maintained. The potentiation effect on [^3H]-ACh release was obtained at 0.1, 1 and 10 μM of (\pm)huprine X ($P < 0.05$). In the presence of MEC (100 μM), the release of evoked- ^3H -ACh enhanced by (\pm)huprine X and ACh was completely blocked.

3.2.3. Effect of choline on [^3H]-ACh release

Previous reports have indicated that choline induces a significant potentiation which is similar to that shown by AChEIs on the same type of nicotinic receptors and pharmacological profile of choline induced to consider it as a physiological co-agonist drug (Zwart and Vijberg, 2000). Using the same experimental approach, the effect of 10 μM choline in the presence and in the absence of 1 μM ACh was studied. In the presence of ACh, choline showed a potentiating effect on the evoked- ^3H -ACh release induced by ACh (52%; $P < 0.01$). Nevertheless, in the absence of ACh no effect was observed (Fig. 6). MEC (100 μM) antagonized the effect of choline.

4. Discussion

The results obtained in the present study demonstrate that (\pm)huprine X, a new AChE inhibitor, not only

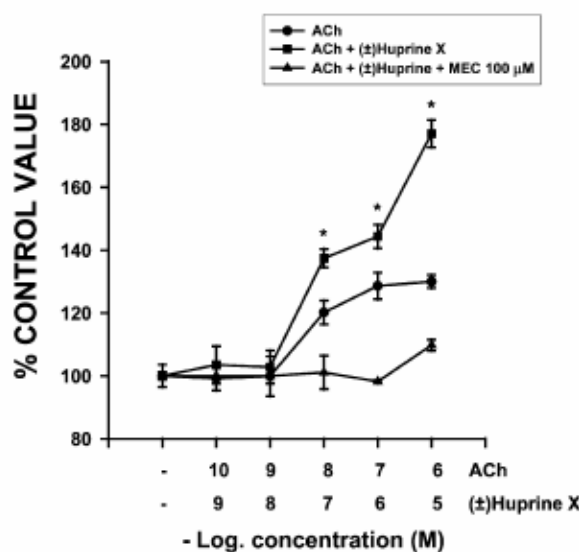


Fig. 5. Effect of ACh (0.0001–1000 μM) in the presence (■) and in the absence (●) of (\pm)huprine X (0.001–10 μM), on the evoked release of [^3H]-ACh in rat cortical synaptosomes. Atropine 0.1 μM was present during the experiment to block M_2 presynaptic receptors. MEC 100 μM was used to revert the effect induced by ACh and (\pm)huprine X (▲). Results were expressed as a percentage of the control group and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed on selected data using Student's *t*-test followed by Bonferroni's test ($*P < 0.05$ including Bonferroni's test correction).

showed an agonist effect on nicotinic receptors in basal conditions (3 mM K^+) but also potentiated the evoked- ^3H -ACh release induced by ACh on nicotinic receptors of cholinergic nerve terminals in a similar way as GAL and PHY.

(\pm)Huprine X is a new AChEI that, in addition to inhibiting the AChE (Camps et al., 2000), has demonstrated itself to be a muscarinic receptor agonist, specially on M_1 receptors (Román et al., 2002). Present data show that (\pm)huprine X also has a nicotinic agonist effect under basal conditions at the highest drug concentration (10 μM), but not under stimulating conditions. It is important to mention that: (i) due to the present experimental design, the interaction of drugs with AChE does not alter the effects of drugs on [^3H]-ACh release (see Materials and methods); and (ii) all experiments were conducted in the presence of atropine (0.1 μM) to avoid interaction of added drugs with muscarinic M_2 receptors and to make nicotinic receptors stand out.

The differences between basal and stimulating conditions could suggest that the sensitivity of a nicotinic receptor probably differs depending on the depolarization degree of the membrane. Accordingly, it has been described that different nicotinic receptor responses can be observed when external membrane voltage is changed, as occurs with other ligand-gated ion channels (Johnson and Ascher, 1987; Mayer et al., 1989).

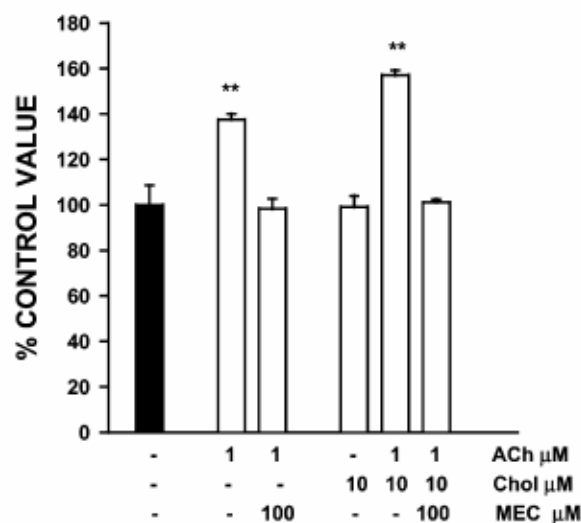


Fig. 6. Effect of choline 10 μM in the presence and in the absence of ACh 1 μM , on the evoked release of [^3H]-ACh in rat cortical synaptosomes. Atropine 0.1 μM was present during the experiment to block M_2 presynaptic receptors. MEC 100 μM was used to revert the effect showed by ACh and (\pm)huprine X. The black column represents the control values. Results were expressed as a percentage of the control group and data are the means \pm SEM of at least four experiments run in triplicate. Statistical evaluation was performed by the one-way ANOVA followed by Dunnett's test (** $P < 0.01$).

As has been stated in the Introduction, PHY and GAL act as a novel class of nicotinic acetylcholine receptor ligands that are able to potentiate nicotinic receptor activity in the presence of the endogenous agonist, ACh (Zwart and Vijverberg, 1997; Zwart and Van Kleef, 1999; Woodruff-Pak and Santos, 2000). Consequently, to establish whether the synaptosomal superfusion system was a suitable experimental approach to study potentiation mechanisms on nicotinic receptors, the effect of both drugs was analyzed in our experimental conditions. Firstly, the effects of PHY (10 μM) and GAL (0.4 μM) were studied in basal conditions. Nevertheless, in such a situation, the [^3H]-ACh release was not modified by PHY and GAL, neither in the absence nor in the presence of exogenous ACh. When the same experiment was performed under stimulating conditions (15 mM K^+), PHY and GAL potentiated the increase of evoked- [^3H]-ACh release induced by ACh 1 μM . These data not only were in agreement with previous reports (Zwart and Vijverberg, 2000; Maelicke et al., 2000), but also suggest that the synaptosomal superfusion system could be an appropriate experimental method to study the potentiation and/or allosteric modulation of nicotinic receptors. In fact, to our knowledge, this is the first time that the allosteric potentiation of [^3H]-ACh release induced by GAL and PHY on nicotinic receptors is reported on presynaptic CNS nerve terminals. Similar data have been described using cell cultures (Zwart and Vijverberg,

2000; Maelicke et al., 2000). It is worth noting that potentiation was only evident when the experiments were developed under stimulating conditions. It might be possible that during stimulation, but not in basal conditions, the binding site for both GAL and PHY could be modified to an active form, inducing pharmacological property changes of nicotinic receptors and increasing the response of such receptors to the endogenous agonist (ACh) when allosteric ligands are present.

Accordingly, the potentiation effect of (\pm)huprine X was studied using the same experimental conditions. As was observed with PHY and GAL, (\pm)huprine X (0.1–30 μM) increased the evoked- [^3H]-ACh release induced by ACh (1 μM) at concentrations of 10 and 30 μM , suggesting a positive modulation of (\pm)huprine X on nicotinic receptors since MEC antagonized this effect. It is important to note that the potentiation effect of (\pm)huprine X was lower at the highest drug concentration (Fig. 3). This effect was also previously described with PHY and GAL. In fact, it is known that high concentrations of both drugs can block the open ion channel (Wachtel, 1993; Storch et al., 1995; Maelicke et al., 2000). Therefore, it could be possible that at the highest concentration (30 μM), (\pm)huprine X blocked the ion channel and, as occurs with PHY and GAL, the potentiation effect was lower than that observed at 10 μM .

The fact that in these experiments the greatest potentiation effect of (\pm)huprine X was observed at 10 μM , in the next set of experiments the effect of (\pm)huprine X at 10 μM was studied in the presence of a wide range of ACh concentrations (0.001–100 μM). As has been previously described (Marchi et al., 1999), increasing concentrations of ACh enhanced the evoked release of [^3H]-ACh release from prefrontal cortical synaptosomes, according to a "bell-shaped" concentration–response curve that agrees with desensitization at high agonist concentrations. Thus, the presence of (\pm)huprine X (10 μM) concomitantly with ACh induced a similar "bell-shaped" concentration–response curve, and the maximum enhancing effect was obtained when the concentration ratio of (\pm)huprine X/ACh was 10:1 (Fig. 4). It is noteworthy, in this regard, that the potentiating effect of GAL on the ACh-induced response was limited to drug concentrations below 1 μM , and that this effect is reversed at higher drug concentrations (Maelicke et al., 2000). These authors suggested that this latter effect was due to a direct channel blockade by GAL. (\pm)Huprine X shows a similar profile of potentiation; nevertheless, in the present experiments the decrease of its potentiation was observed when the ACh, but not (\pm)huprine X, concentration was increased up to 1 μM . Therefore, these data are more consistent with a desensitization secondary to an initial nicotinic receptor activation rather than to a blockade of open ion channels by (\pm)huprine X.

It is assumed that insufficient levels of ACh at cortical

synapses severely impair the modulatory function of this neurotransmitter, and it has been described that in AD patients the cortical ACh levels are decreased by about 50% as compared to normal elderly people (Giacobini, 1998). In the present study (\pm)huprine X was able to potentiate the effects of ACh on nicotinic receptors even at low neurotransmitter concentrations. Moreover, taking into account that the maximum potentiation effect was obtained at a concentration ratio of (\pm)huprine X/ACh 10:1, the effect of different (\pm)huprine X concentrations (0.001 M–10 μ M) on increasing concentrations of ACh (0.0001–1 μ M), maintaining the concentration ratio at 10:1 was analyzed. In such conditions, 0.1 μ M of (\pm)huprine X was able to potentiate the effects of ACh on evoked-[³H]-ACh even at such low ACh concentrations as 0.1 μ M (Fig. 5). Consequently, (\pm)huprine X shows a wide cholinergic profile since, in addition to its anticholinesterase activity (Camps et al., 2000), it is a muscarinic (Román et al., 2002) and nicotinic receptor agonist and, more importantly, it has shown a wide potentiating effect on nicotinic receptors.

It has been demonstrated that in cultured hippocampal neurons and hippocampal slices choline has an agonist effect on $\alpha 7$ nicotinic receptors but not on $\alpha 4\beta 2$ receptors (Alkondon et al., 1997, 1999). In addition, in the presence of ACh, choline acts as a coagonist on $\alpha 4\beta 4$ nicotinic receptors, enhancing the effects of the neurotransmitter on such receptors expressed in *Xenopus* oocytes cell (Zwart and Vijverberg, 2000). In the present study, choline modified the release of [³H]-ACh in the presence of exogenous ACh (potentiation effect) but not in the absence of this ACh. These results could suggest that nicotinic receptors located at the presynaptic levels of cholinergic neurons in the frontal cortex do not belong to the $\alpha 7$ receptor type but could be $\alpha 4\beta 4$ type. Nevertheless, results obtained herein do not allow us to predict which nicotinic receptor subtypes are located at such nerve terminals.

In summary, in the present study it has been demonstrated that the acetylcholinesterase inhibitor, i.e. (\pm)huprine X, has a dual action on cortical nicotinic receptors. Firstly, (\pm)huprine X showed an agonistic effect on such receptors but only at the highest drug concentration and in basal conditions. However, the most relevant results obtained herein are related to the ability of (\pm)huprine X to enhance the potency or effectiveness of ACh by an effect involving nicotinic receptors, although we cannot completely discard that the results could be explained by acetylcholine esterase inhibition. The fact that the anticholinesterase drug was able to enhance the effects of ACh on nicotinic receptors, specifically, at very low concentrations of the neurotransmitter indicates that (\pm)huprine X could potentially be useful in the symptomatic treatment of AD. Nevertheless, a more detailed characterization of the pharmacological profile of (\pm)huprine X is required.

Acknowledgements

This work was partially supported by DGICYT (SAF99-0088), DGICYT (SAF2002-00049), and CIRIT (2001GSR00216). The authors wish to thank Dr. Jesus Giraldo from the Statistical Department of the UAB for support in statistical analysis. The English of this manuscript has been revised and corrected by a native English-speaking English instructor of this University.

References

- Alkondon, M., Pereira, E.F., Cortes, W.S., Maelicke, A., Albuquerque, E.X., 1997. Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in rat brain neurons. *European Journal of Neuroscience* 9, 2742.
- Alkondon, M., Pereira, E.F., Eisenberg, H.M., Albuquerque, E.X., 1999. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *Journal of Neuroscience* 19, 2705.
- Badia, A., Baños, J.E., Camps, P., 1998. Synthesis and evaluation of tacrine-huperzine A hybrids as acetylcholinesterase inhibitors of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganics and Medicinal Chemistry* 6, 427–440.
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S., 1984. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408–417.
- Benzi, G., Moretti, A., 1998. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *European Journal of Pharmacology* 346, 1–13.
- Birdsall, N.J.M., Nathanson, N.M., 2001. Muscarinic receptors: it's a knockout. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 215–219.
- Camps, P., El Achab, R., Morral, J., Muñoz-Torrero, D., Badia, A., Baños, J.E., Vivas, N.M., Barril, X., Orozco, M., Luque, F.J., 2000. New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 43, 4657–4666.
- Cheng, D.H., Tang, X.C., 1998. Comparative studies of Huperzine A, E2020 and tacrine on behavior and cholinesterase activities. *Pharmacological Biochemistry Behavior* 60, 377–386.
- DeKosky, S.T., López, O.L., 1998. Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Neurológica* 27, s16–s24.
- García-Sanz, A., Badia, A., Clos, M.V., 2001. Superfusion of synaptosomes to study presynaptic mechanisms involved in neurotransmitter release from rat brain. *Brain Research Protocols* 7, 94–102.
- Giacobini, E., 1998. Invited review cholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications. *Neurochemistry International* 32, 413–419.
- Gray, E.G., Whittaker, V.P., 1962. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *Journal of Anatomy* 96, 79–88.
- Johnson, J.W., Ascher, P., 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529–531.
- Maelicke, A., Albuquerque, E.X., 2000. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology* 393, 165–170.
- Maelicke, A., Schratzenbolz, A., Samochocki, M., Radima, M., Albuquerque, E.X., 2000. Allosterically potentiating ligands of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 113, 199–206.
- Marchi, M., Lupinacci, M., Bernero, E., Bergaglia, F., Raiteri, M., 1999. Nicotinic receptors modulating ACh release in rat cortical

- synaptosomes: role Ca^{2+} ions in their function and desensitization. *Neurochemistry International* 34, 319–328.
- Marchi, M., Raiteri, M., 1996. Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of “impaired” cholinergic presynaptic function. *Journal of Neurochemistry* 67, 1974–1981.
- Martin-Ruiz, C.M., Court, J.A., Molnar, E., Lee, M., 1999. $\alpha 4$ but not $\alpha 3$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer’s disease. *Journal of Neurochemistry* 73, 1635–1640.
- Mayer, M.L., Vyklícký, L. Jr., Westbrook, G.L., 1989. Modulation of excitatory amino acid receptors by groups IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurons. *Journal of Physiology* 415, 329–350.
- Nilsson, L., Adem, A., Hardy, J., Winblad, B., Nordberg, A., 1987. Do tetrahydroaminoacridine (THA) and physostigmine restore acetylcholine release in Alzheimer brains via nicotinic receptors? *Journal of Neuronal Transmission* 70, 357–368.
- Raiteri, M., Angelini, F., 1974. A simple apparatus for studying the release of neurotransmitters from synaptosomes. *European Journal of Pharmacology* 25, 411–414.
- Román, S., Vivas, N.M., Badia, A., Clos, M.V., 2002. Interaction of a new potent anticholinesterasic compound, (\pm)Huprine X with muscarinic receptors in rat brain. *Neuroscience letters* 325, 103–106.
- Ros, E., Aleu, J., Gómez de Aranda, I., Cantí, C., Pang, Y.P., Marsal, J., Solsona, C., 2001. Effects of bis(7)-tacrine on spontaneous synaptic activity and on the nicotinic ACh receptor of Torpedo electric organ. *Journal of Neurophysiology* 86, 183–189.
- Schöder, H., Wevers, A., 1998. Nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Disease Reviews* 3, 20–27.
- Schrattenholz, A., Pereira, E.F., Roth, U., Weber, K.H., Albuquerque, E.X., Maelicke, A., 1996. Agonist responses of neural nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Molecular Pharmacology* 49, 1–6.
- Storch, A., Schrattenholz, A., Cooper, J.C., Abdel Ghani, M., Gutbrod, O., Weber, K.H., Reinhart, S., Lobbbron, C., Hermsen, B., Soskić, V., Pereira, E.F., Albuquerque, E.X., Methfessel, C., Maelicke, A., 1995. Physostigmine, galanthamine and codeine act as “noncompetitive nicotinic receptor agonists” on clonal rat pheochromocytoma cells. *European Journal of Pharmacology* 290, 207–219.
- Tang, X.C., Han, Y.F., 1999. Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chinese herb. *CNS Drug Reviews* 5, 281–300.
- Wachtel, R.E., 1993. Physostigmine block of ion channels activated by acetylcholine in BC3H1 cells. *Molecular Pharmacology* 44, 1051–1055.
- Woodruff-Pak, D.S., Santos, I.S., 2000. Nicotinic modulation in an animal model of a form of associative learning impaired in Alzheimer’s disease. *Behavior Brain Research* 113, 11–19.
- Zwart, R., van Kleef, R., 1999. Physostigmine and atropine potentiate and inhibit neuronal $\alpha 4\beta 4$ nicotinic receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 886, 636–639.
- Zwart, R., Vijverberg, H., 1997. Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and no competitive effects. *Molecular Pharmacology* 52, 886–895.
- Zwart, R., Vijverberg, H., 2000. Potentiation and inhibition of neural $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by choline. *European Journal of Pharmacology* 393, 209–214.

4. Anexo



“Lo más triste de la vejez es carecer de ella”.

Santiago Ramón y Cajal, Premio Nobel de Fisiología y Medicina
(1852-1934)

4.1. PRP₁₀₆₋₁₂₆ MINIPRION AGGREGATION INDUCED BY ACETYLCHOLINESTERASE

1. Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies are caused by an extra-cellular surface protein, the scrapie prion protein (PrP^{Sc}), which is an aberrant form of normal and functional cellular prion protein (PrP^{C}). The pathological hallmarks of these diseases are the accumulation and deposition of PrP^{Sc} in the form of amyloid fibrils in the central nervous system (Tateishi *et al.*, 1988). Similar events occur in Alzheimer disease (AD), where the aggregation of amyloid β protein ($\text{A}\beta$) constitutes one of the most important features (DeKosky and López, 1998). The main physicochemical characteristics that distinguish PrP^{Sc} from PrP^{C} is the high content of β -sheet secondary structure strongly resistant to proteolytic digestion, as what occurs with $\text{A}\beta$ protein (Cohen and Prusiner, 1998; Selvaggini *et al.*, 1993).

It has been observed, in some patients, that $\text{A}\beta$ and prion pathology can coexist (Muramoto *et al.*, 1992; Hainfellner *et al.*, 1998) and a common spatial pattern of protein deposition in both pathologies has been described (Armstrong *et al.*, 2001). The nature and size of plaques are very similar and the morphology of multicentric PrP^{Sc} plaques looks like $\text{A}\beta$ immunoreactive senile plaques (Kovács and Budka, 2002) and, in addition, a similar location and distribution of PrP^{Sc} and $\text{A}\beta$ deposits clusters can be observed in the cerebral cortex in Creutzfeldt Jakob disease (CDJ) and AD (Armstrong *et al.*, 2001).

Although the triggering mechanism of the aggregation of the amyloid protein is not well-known, it has been described that acetylcholinesterase (AChE), an important component of cholinergic synapses, colocalizes with $\text{A}\beta$ deposits of brains in Alzheimer's disease and accelerates assembly of $\text{A}\beta$ peptides (Inestrosa and Alvarez, 1996). This noncatalytic function of the enzyme has been related to the peripheral anionic site close to the entrance of the active-site gorge, and it has been widely described that AChE directly promotes the aggregation of the βA peptide into amyloid fibrils through its activation (Inestrosa and Alvarez, 1996; Alvarez *et al.*, 1995).

The amyloidogenic effect of AChE in AD has been well-documented (Inestrosa and Alvarez, 1996; Bartolini *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 1998; Muñoz and Inestrosa, 1999)

and, recently, it has been demonstrated that propidium, a purely non-specific cholinesterase inhibitor (AChEI) (Szegetes *et al.*, 1999) binds to the peripheral site decreasing the β A protein aggregation. A similar effect can be observed with non-selective bisquaternary inhibitor decamethonium, which also can decrease protein aggregation (Bartolini *et al.*, 2003). Nevertheless, active-site competitive inhibitors like edrophonium did not show any effect on induced $A\beta$ fibrillogenesis (Campos *et al.*, 1998; Barak *et al.*, 1994).

The PrP₁₀₆₋₁₂₆ peptide, derived from mouse-infectious PrP, is a synthetic protein without any biologically contaminant activity and is especially desirable for biological assays (Riek *et al.*, 1997; Bonetto *et al.*, 2002; De Giogia *et al.*, 1994). PrP₁₀₆₋₁₂₆ was found to show most of the PrP^{Sc} properties, including β -sheet conformation and amyloid fibrils formation which are able to induce both nerve cell degeneration and glial cell activation *in vitro* (Bonetto *et al.*, 2002; Forloni *et al.*, 1993; De Giogia *et al.*, 1994). Thus, the main goal of the present study is to analyse the AChE aggregation activity on PrP₁₀₆₋₁₂₆ deposition based on the common features described between $A\beta$ and PrP^{Sc}. Preliminary data have shown that AChE is able to induce the PrP^{Sc} aggregation in a similar way as has been previously described with $A\beta$ protein.

2. Material and Methods

The following drugs were used: Bovine erythrocyte AChE and propidium iodide were obtained from Sigma Aldrich. (\pm)Huprine X and huperzine A were provided by Dr Pelayo Camps, from the *Laboratori de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona*. Wild-type PrP₁₀₆₋₁₂₆ peptide (K¹⁰⁶TNMKHMAGAAAAGAVVGGGLG) and scramble PrP₁₀₆₋₁₂₆ peptide (K¹⁰⁶NGKALMGGHGATKVMGAAA) were a generous donation by Dr Mario Salmona, from the *Istituto di Recerche Farmacologiche, Milan*.

2.1 Preparation of samples

Lyophilised aliquots of the PrP₁₀₆₋₁₂₆ peptide were suspended in 200 mM TRIS-HCl (pH 7.0) at a concentration of 1 mM. To generate amyloid fibrils, samples were vigorously shaken and incubated for 72 hours at room temperature (Selvaggini *et al.*, 1993). When the experiments were developed in the presence of AChE, the enzyme was added to the peptide suspension to a final concentration of 2.5 μ M and incubated in the same experimental conditions. To study the anti-aggregating effect of AChEI, the peptides were previously dissolved in the TRIS-HCl solution to achieve the different concentrations studied. After that, they were added to the incubation medium in the presence or in the absence of AChE. After incubation, samples containing soluble and aggregated PrP₁₀₆₋₁₂₆ were separated by centrifugation at 13000 rpm for 10 minutes, and both fractions were stored at -20 °C for posterior analysis by HPLC.

High pressure liquid chromatography (HPLC) analysis. Supernatants and pellets containing PrP₁₀₆₋₁₂₆ soluble and aggregate forms were quantified by HPLC on a reverse C4 column (symmetry 300 19x150 mm particle size 7 μ m; Waters), using a mobile phase of 0.1 % TFA: water (eluent A) and 0.08 % TFA: acetonitrile (eluent B) with a non-linear gradient of 0%-60% solvent B for 20 min. The column eluents were analysed at 240 nm and the absorbing peak was obtained at 22 minutes at 0.5 ml/min. Before injecting the sample, formic acid was added to the pellet, and supernatant fractions to disassemble amyloid aggregates formed during the incubation period, making the pass of the peptide through the HPLC column easier.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm SEM. Variances of groups were compared using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test where appropriate.

3. Results

3.1. Spontaneous aggregation of miniprion wild-type and scramble Prp₁₀₆₋

126°

The spontaneous aggregation of the PrP₁₀₆₋₁₂₆ (1 mM) peptide was analysed at 0 h and after 72 h of incubation by HPLC measurement. The percentage of total PrP₁₀₆₋₁₂₆ content in the supernatant (soluble form) and in the pellet (aggregate form) can be observed in Fig 1a. The 78.8%± 6 of total PrP₁₀₆₋₁₂₆ content was located in the pellet, while only 20.7%±2.3 remained in soluble form after 72 h of incubation. The scramble type of synthetic peptide PrP₁₀₆₋₁₂₆ did not form amyloid fibrils, and the pellet fraction only contained a small amount of aggregated protein; however, the supernatant fraction contained the greatest quantity of scramble protein PrP₁₀₆₋₁₂₆ (**Fig 1**).

3.2. Effect of bovine erythrocyte AChE on PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation.

The amyloid fibrils formation of wild-type PrP₁₀₆₋₁₂₆ (1 mM) was studied in the presence of 2.5 μM of bovine erythrocyte AChE. No PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation was found at 0 h using HPLC analysis. Unexpectedly, after 72 hours of incubation, the percentage of wild-type PrP₁₀₆₋₁₂₆ in the pellet dramatically decreased (25.8%±2.1; P<0.001) (**Fig 2**) compared with the PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation experiments in the absence of AChE. The content of the supernatant fraction (the non-aggregated peptide) was as low as 2.8%±0.8 (P<0.001).

The concomitant presence of scramble PrP₁₀₆₋₁₂₆ and AChE did not modify the results obtained in the absence of the enzyme (**Fig 2**).

The fact that in the presence of AChE the total content of PrP₁₀₆₋₁₂₆ in both pellet and supernatant fractions was only 28.6% of the total protein content present in the incubation medium was very surprising. It was probably due to the size of aggregates induced by AChE which were so big that they were unable to pass through the column filter of HPLC. Neither formic acid nor protein kinase K were able to solubilise the aggregates formed. Therefore, PrP₁₀₆₋₁₂₆ protein content detected in the pellet fraction could correspond to the small-sized aggregates.

3.3. Effects of propidium iodide on the PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation induced by AChE.

In the next set of experiments the PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation induced by AChE was analysed in the presence of different concentrations of propidium (0.1, 1, 10 and 100 μ M), an inhibitor of the peripheral site of AChE. Propidium iodide was concomitantly added with AChE to the incubation medium and the pellets and supernatants were analysed by HPLC. As **Fig 3** shows, propidium increased the content of PrP₁₀₆₋₁₂₆ in the pellet fraction, as compared with the results obtained in the presence of AChE alone. This increase was significant at 10 μ M (50% \pm 1.78, P<0.05) and at 100 μ M (68 \pm 1.3 %, P<0.01). At these concentrations, propidium iodide also induced a recovery in the soluble PrP₁₀₆₋₁₂₆, similar to the control group's value. Propidium iodide alone did not modify the spontaneous peptide aggregation at any drug concentration studied (data not shown).

3.4. Effects of (\pm)huprine X and huperzine A on the PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation induced by AChE.

In the next set of experiments the PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation induced by AChE 2.5 μ M was analysed in the presence of different concentrations of two AChEI potentially useful for symptomatic AD treatment, (\pm)huprine X (0.01, 0.1 and 1 mM) and huperzine A (1 mM).

The presence of (\pm)huprine X (**Fig 3**) significantly increased the PrP₁₀₆₋₁₂₆ content in the pellet fraction as compared with data obtained in the presence of AChE alone (at 0.1 mM 48% \pm 2.8; P<0.05 and at 1 mM 51% \pm 2.31; P<0.05). (\pm)Huprine X alone did not modify the spontaneous peptide aggregation at any drug concentration studied (data not shown). Huperzine A (1mM) did not modify the PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation induced by AChE (**Fig 3**).

4. Conclusion and Discussion.

Data obtained in the present experiments are the preliminary results of a more in-depth analysis about interaction of AChE and PrP₁₀₆₋₁₂₆. Aggregation studies developed in the presence of AChE have demonstrated that, as occurs with A β protein (Inestrosa and Alvarez, 1996; De Ferrari *et al.*, 2001), the aggregation process of PrP₁₀₆₋₁₂₆ is induced by the enzyme, and compounds which block the peripheral site of AChE inhibited this process.

In accordance with a previous report (De Giogia *et al.*, 1994), data obtained in the present experiments show that PrP₁₀₆₋₁₂₆ spontaneously aggregates (78.8%) after 72 h of incubation. It is known that the transition of PrP^c to PrP^{sc} involves a conformational change with a decrease in the α -helical secondary structure and a significant increase in β -sheet content (Eigen, 1996; Cohen and Prusiner, 1998; Kitamoto *et al.*, 1992). This structural change implies modifications in the physiochemical properties, including insolubility in non-denaturing detergents and partial resistance to protein kinase K digestion (Prusiner, 1982). In addition, the PrP^{sc} peptide assembles by forming small β -sheet oligomers which, with further growth, produce amyloid-like fibrils. These fibrils show features and staining properties similar to those described in the Alzheimer's A β protein (Kovács and Budka, 2002).

When AChE was included in the incubation medium, the PrP₁₀₆₋₁₂₆ content in both pellet and supernatant drastically decreased. It has been stated in the Method section that in these conditions the aggregate size was so large that, consequently, they could not pass through the column filter, and it was not possible to detect the PrP₁₀₆₋₁₂₆ content in the pellet fraction by the HPLC method. Neither formic acid nor protein kinase K were able to solubilise the aggregates. Although it was not possible to directly quantify the aggregation induced by AChE, the total content of PrP₁₀₆₋₁₂₆ detected in pellet and supernatant fractions, was 28.6%.

Therefore, this suggests that about 71.4% of PrP₁₀₆₋₁₂₆ was included in the large-sized aggregates. However, these results are not conclusive, they also suggest that AChE induces the aggregation process and, in addition, increases the aggregate size. This aggregation effect of AChE on PrP₁₀₆₋₁₂₆ would be similar to those previously

described with A β (Campos *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 1995; Bartolini *et al.*, 2003), in which an increase in the aggregate size and high stability of aggregates have been observed in the presence of the enzyme (Alvarez *et al.*, 1998).

The pro-aggregating effect of AChE was inhibited by propidium iodide, a selective blocker of the peripheral site of the enzyme. The values of PrP₁₀₆₋₁₂₆ content in the pellet and in the supernatant fraction at the highest concentration of propidium, 100 μ M, were close to those observed in the spontaneous aggregation process of PrP₁₀₆₋₁₂₆ (68% in the pellet fraction and 18% in the supernatant fraction). The reversal of the effect of AChE by propidium iodide was similar to that described in previous studies on the AChE pro-aggregation effect on A β protein (Bartolini *et al.*, 2003). In the present experiments propidium iodide at 100 μ M inhibited the AChE-induced PrP_{106/126} aggregation by 85%.

(\pm)Huprine X at 0.1 mM and 1 mM was also able to partially inhibit the pro-aggregating effect of AChE. Studies performed by using a crystallographic method (Camps *et al.*, 2000) have demonstrated that (\pm)huprine X, a new AChEI, interacts not only with the catalytic site of the enzyme, but also with the peripheral site. The association -and dissociation- rate constants for (\pm)huprine X with AChE was also determined, and the location of their binding site on the enzyme was tested in competition studies with the peripheral site inhibitor propidium and the acylation site inhibitor edrophonium. Results indicate that (\pm)huprine X binds to the enzyme acylation site in the active site gorge but also shows a slight affinity with the peripheral anionic site (Camps *et al.*, 2000). Therefore the ability of (\pm)huprine X to revert the AChE effect on the PrP₁₀₆₋₁₂₆ aggregation process could point appointed to an interaction of AChEI with the peripheral site. The study of the affinity of huperzine A to the AChE peripheral site suggested a lower or non interaction between AChEI and the peripheral site (Camps *et al.*, 2000). In the current study the presence of huperzine A (1 mM) in the incubation medium with AChE and PrP₁₀₆₋₁₂₆, did not induce any effect in the pro-aggregating activity of the enzyme.

These preliminary data show that AChE is able to induce PrP^{Sc} aggregation in a similar way as has been previously described with the β A protein, therefore, it could be suggested that the amyloidogenic effect of AChE would probably be a general mechanism rather than a selective action on β A protein.

5. References

1. Alvarez,A., Alarcón,R., Opazo,C., Campos,E.O., Muñoz,F.J., Calderón,F.H., Dajas,F., Gentry,M.K., Doctor,B.P., De Mello,F.G., Inestrosa,N.C., 1998. Stable complexes involving acetylcholinesterase and amyloid- β peptide change the biochemical properties of the enzyme and increase the neurotoxicity of Alzheimer's fibrils. *J.Neurosc.* 18, 3213-3223.
2. Alvarez,A., Bronfman,F., Pérez,C.A., Vicente,M., Garrido,J., Inestrosa,N.C., 1995. Acetylcholinesterase, a senile plaque component, affects the fibrillogenesis of amyloid- β -peptides. *Neurosci.Lett.* 201, 49-52.
3. Armstrong,R.A., Lantos,P.L., Cairns,N.J., 2001. The spatial patterns of prion protein deposits in Creutzfeldt-Jakob disease: comparison with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.* 298, 53-56.
4. Barak,D., Kronman,C., Ordentlich,A., Ariel,N., Bromberg,A., Marcus,D., Lazar,A., Velan,B., Shafferman,A., 1994. Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J.Biol.Chem.* 269, 6296-6305.
5. Bartolini,M., Bertucci,C., Cavrini,V., Andrisano,V., 2003. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem.Pharm.* 65, 407-416.

6. Bonetto,V., Massignan,T., Chiesa,R., Morbin,M., Mazzoleni,G., Diomedea,L., Angeretti,N., Colombo,L., Forloni,G., Tagliavini,F., Salmona,M., 2002. Synthetic miniprion PrP106. *J.Biol.Chem.* 277, 31327-31334.
7. Campos,E.O., Alvarez,A., Inestrosa,N.C., 1998. Brain acetylcholinesterase promotes amyloid-beta-peptide aggregation but does not hydrolyze amyloid precursor protein peptides. *Neurochem.Res.* 23, 135-140.
8. Camps,P., Cusack,B., Mallender,W.D., El Achab,R., Morral,J., Muñoz-Torrero,D., Rosenberry,T.L., 2000. Huprine X is a novel high-affinity inhibitor of acetylcholinesterase that is of interest for treatment of Alzheimer's disease. *Mol.Pharmacol.* 57, 409-417.
9. Cohen,F.E., Prusiner,S.B., 1998. Pathologic conformation of prion proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 67, 793-819.
10. De Ferrari,G.V., Canales,M.A., Shin,I., Weiner,L.M., Silman,I., Inestrosa,N.C., 2001. A structural motif acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* 40, 10447-10457.
11. De Giogia,L., Selvaggini,C., Bugiani,O., Forloni,G., Tagliavini,F., Salmona,M., 1994. Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *J.Biol.Chem.* 269, 7859-7862.
12. DeKosky,S.T., López,O.L., 1998. Neurobiología y biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Neurológica* 27, s 16-s 24.
13. Eigen,M., 1996. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys.Chem.* 63, A1-A18.

14. Forloni,G., Angeretti,N., Chiesa,R., Monzani,E., Salmona,M., Bugiani,O., Tagliavini,F., 1993. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362, 543-545.
15. Hainfellner,J.A., Wanschitz,J., Jellinger,K., Liberski,P.P., Gullotta,F., Budka,H., 1998. Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.(Berl)* 96, 116-122.
16. Inestrosa,N.C., Alvarez,A., 1996. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*. 16, 881-891.
17. Kitamoto,T., Doh-ura,K., Muramoto,T., Tateishi,J., 1992. The primary structure of the prion protein influences the distribution of abnormal prion protein in the central nervous system. *Am.J.Pathol.* 141, 271-277.
18. Kovács,G.G., Budka,H., 2002. Aging, the brain and human prion disease. *Exp.Gerontol.* 37, 603-605.
19. Muñoz,F.J., Inestrosa,N.C., 1999. Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid b-peptide aggregates is dependent on the type of Ab peptide and the AChE concentration present in the complexes. *FEBS Lett.* 450, 205-209.
20. Muramoto,T., Kitamoto,T., Koga,H., Tateishi,J., 1992. The coexistence of Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with dementia of long duration. *Acta Neuropathol.(Berl)* 84, 686-689.
21. Prusiner,S.B., 1982. Novel proteinaceous infectious particle cause scrapie. *Science* 216, 136-144.

22. Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Glockshuber,R., Wuthrich,K., 1997. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). FEBS Lett. 413, 282-288.
23. Selvaggini,C., De Giogia,L., Cantù,L., Ghibaudi,E., Diomedea,L., Passerini,F., Forloni,G., Bugiani,O., Tagliavini,F., Salmona,M., 1993. Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. Biochem.Biophys.Res.Comm. 194, 1380-1386.
24. Szegletes,T., Mallender,W.D., Thomas,P.J., Rosenberry,T.L., 1999. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. Biochemistry 38, 122-133.
25. Tateishi,J., Kitamoto,T., Hashiguchi,H., Shii,H., 1988. Gerstmann-Straussler-Scheinker disease: immunological and experimental studies. Ann.Neurol. 24, 35-40.

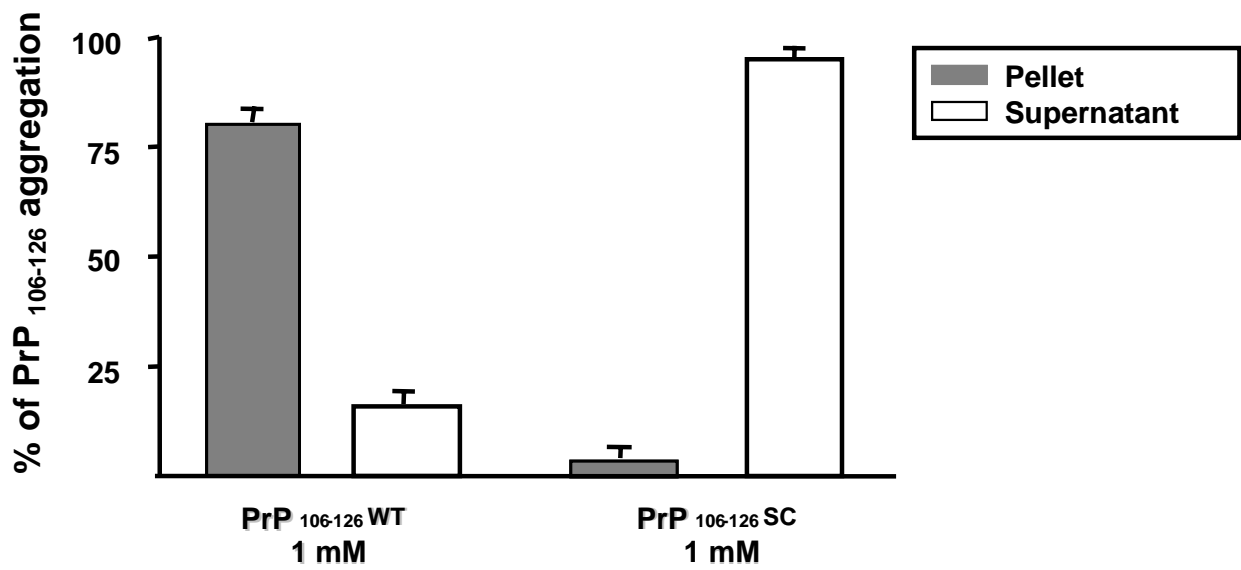


Fig 1. Results show the percentage of wild-type (WT) and scramble (SC) prion peptide PrP₁₀₆₋₁₂₆ (1 mM), recovered in the pellet fraction (aggregated protein) and in the supernatant fraction (non-aggregated protein), after 72 hours of incubation at 25°C. Results are expressed as mean ± SEM of four experiments performed in triplicate

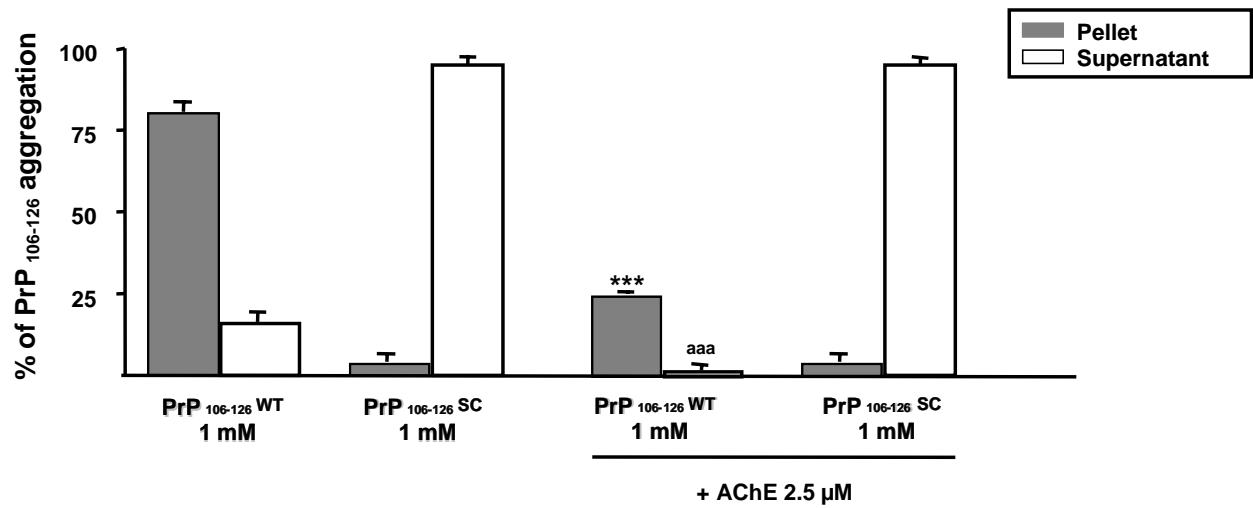


Fig 2. Results show the percentage of wild-type (WT) and scramble (SC) prion peptide PrP₁₀₆₋₁₂₆ (1 mM), recovered in the pellet fraction (aggregated protein) and in the supernatant fraction (non-aggregated protein), after 72 hours of incubation at 25°C, in the absence and in the presence of 2.5 M AChE. Results are expressed as mean ± SEM of four experiments performed in triplicate (***) P < 0.001 vs pellet content of PrP₁₀₆₋₁₂₆ WT in the absence of AChE; aaa P < 0.001 vs supernatant content of PrP₁₀₆₋₁₂₆ WT in the absence of AChE)

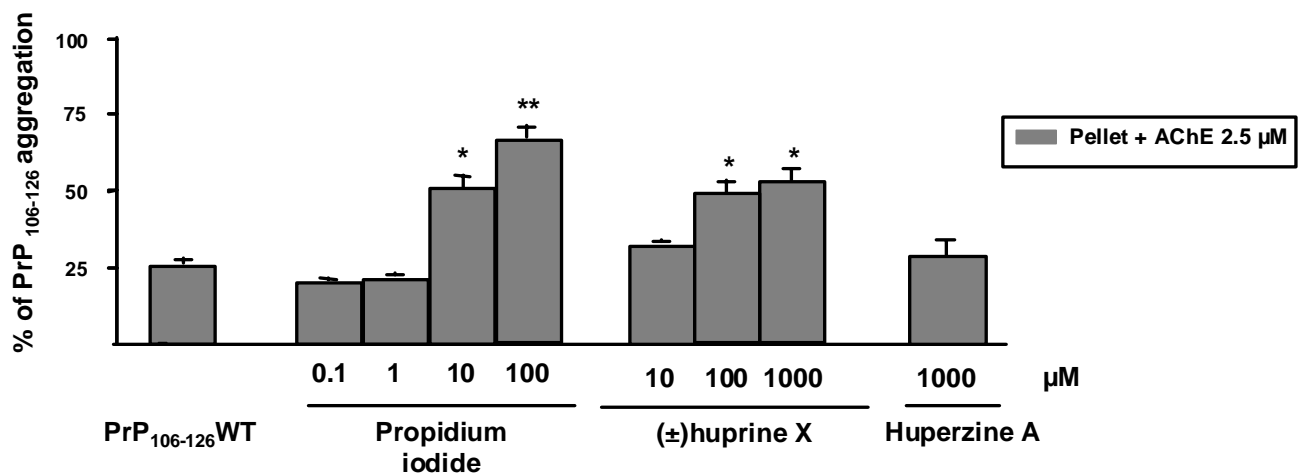


Fig 3. Results show the percentage of wild-type (WT) prion peptide PrP₁₀₆₋₁₂₆ (1 mM) recovered in the pellet fraction (aggregated protein), after 72 hours of incubation at 25°C, in the presence of 2.5 μM AChE and the absence and in the presence of propidium iodide (0.1-100 μM), (±)huprine X (10, 100 and 1000 μM) and huperzine A (1000 μM). Results are expressed as mean±SEM of four experiments performed in triplicate. (** P< 0.01 y * P< 0.05 vs results obtained in the presence of AChE and in the absence of propidium iodide and (±)huprine X, respectively).

1. Los estudios de afinidad de la (\pm)huprina X sobre los receptores muscarínicos de tipo M_1 y M_2 mediante la técnica de unión de radioligandos demuestran que la (\pm)huprina X desplaza tanto la pirenzepina- $[^3H]$ como el quinuclidinylbenzilato- $[^3H]$ con unas K_i de rango μM mostrando una afinidad 14 veces superior por los receptores M_1 .
2. Los estudios funcionales realizados en terminales colinérgicos en corteza prefrontal de rata mediante la técnica de superfusión de sinaptosomas, indican que la (\pm)huprina X tiene un efecto agonista sobre los receptores M_2 . Así mismo, y de acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de unión de radioligandos, este efecto requiere concentraciones aproximadamente 10 veces superiores a las que muestra un efecto agonista sobre los receptores M_1 .

3. Los estudios funcionales realizados en terminales dopaminérgicos en tejido estriado de rata mediante la técnica de superfusión de sinaptosomas indican que:
 - 3.1. La(±)huprina X incrementa la liberación de [³H]-DA mediante un efecto agonista sobre los receptores M₁, dado que la atropina, un bloqueante de los receptores muscarínicos, inhibe parcialmente este efecto.
 - 3.2. La(±)huprina X presenta un efecto agonista sobre los receptores nicotínicos ya que el incremento de la liberación de [³H]-DA es también parcialmente bloqueado por la mecamilamina, un antagonista de dichos receptores.
 - 3.3. La presencia de ambos antagonistas no revirtió por completo el efecto de la (±)huprina X sobre la liberación de [³H]-DA, resultados que indican que la (±)huprina X podría modular la liberación de este neurotransmisor a través de mecanismos no relacionados con los receptores colinérgicos.

4. De los estudios funcionales sobre la interacción de la (±)huprina X con los receptores nicotínicos pudo demostrarse que:
 - 4.1. El sistema de superfusión de sinaptosomas es un método apropiado para el estudio de potenciación de los receptores nicotínicos tal como lo demuestran los resultados obtenidos con la galantamina y la fisostigmina.
 - 4.2. La (±)huprina X además de interactuar directamente con los receptores nicotínicos, presenta un efecto potenciador sobre dichos receptores en presencia de ACh en terminales colinérgicos de corteza prefrontal de rata

- 4.3. El efecto potenciador tiene lugar a bajas concentraciones del neurotransmisor ACh (0.01 μ M), por lo que podría ser de especial interés en el tratamiento sintomático de la EA.
5. De los estudios funcionales realizados en cortes de estriado de rata mediante la técnica de superfusión de cortes de tejido se desprende que:
 - 5.1. La (\pm)huprina X, la galantamina (ambos potenciadores de los receptores nicotínicos) y la huperzina A (compuesto que carece de este efecto) inhiben de igual modo la liberación de ACh- 3 H] y que la presencia de atropina revierte este efecto.
 - 5.2. El bloqueo concomitante de los receptores muscarínicos y dopaminérgicos del tipo D₂, puso de manifiesto un incremento en la liberación de la ACh- 3 H] que fue superior en el caso de la (\pm)huprina X y la huperzina A comparado con el de la galantamina.
 - 5.3. Estos resultados sugieren que en un sistema integrado, dónde la liberación de ACh está sujeta a distintos moduladores, el efecto de los IChE potenciadores de los receptores nicotínicos es debido a su acción sobre la enzima y no a su efecto sobre dichos receptores.
 6. Los estudios preliminares sobre la acción proagregante de la AChE sobre la PrP₁₀₆₋₁₂₆ y su inhibición por parte de compuestos anticolinesterásicos demuestran que:
 - 6.1. La capacidad proagregante de la AChE, que ha sido ampliamente demostrada en el caso de la proteína β A, también se observa en presencia del péptido priónico PrP₁₀₆₋₁₂₆.
 - 6.2. El hecho que el propidium, un IChE que actúa sobre el locus periférico de la AChE, es capaz de bloquear el efecto proagregante de la enzima sobre la PrP₁₀₆₋₁₂₆, sugiere que el mismo mecanismo implicado en la acción proagregante sobre la PrP₁₀₆₋₁₂₆, puede estar relacionado con el descrito previamente para la proteína β A

- 6.3. La (\pm)huprina X bloquea parcialmente el efecto proagregante inducido por la AChE sobre la PrP₁₀₆₋₁₂₆. Ello implicaría que el perfil farmacológico de la (\pm)huprina X se amplía mostrando otro efecto potencialmente útil para el tratamiento de la EA.