

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL SISTEMA
SOMATOSTATINÉRGICO CEREBRAL DE
LA RATA CON ENCEFALOMIELITIS
AUTOINMUNE EXPERIMENTAL.**

**TESIS PRESENTADA POR DAVID AGUADO LLERA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA**

A Rosa
A mis padres y hermanos

*“Lo que hacemos por nosotros dura toda nuestra vida; lo que hacemos por los demás
permanece y es inmortal”*

ALBERT PIKE

“Los amigos que tienes y cuya amistad ya has puesto a prueba, engánchalos a tu alma con ganchos de acero.”

WILLIAM SHAKESPEARE

Una vez acabada esta tesis doctoral, siento que algo muere en mí a la vez que algo nuevo nace. Un ciclo se cierra dando paso a uno nuevo, a un nuevo comienzo en el que, igual que cuando empecé, le pido a Dios que lleve a buen término. Pero antes de comenzar, siento que debo algo a todos aquellos que me han acompañado en estos años.

A *EDUARDO* tengo que agradecerle que me ofreciera la oportunidad de comenzar mi viaje por el mundo de la ciencia. Fue él quien depositó su confianza en mí para llevar a cabo las investigaciones que componen esta tesis. Gracias también por tu inestimable ayuda, tu interminable guía y tu incombustible ánimo.

A *LILIAN* le doy las gracias por haber sido mi luz en el oscuro camino de la investigación. Ella ha sido amiga y maestra. Ha estado siempre al pie del cañón, guiando mis pasos y poniendo siempre la guinda a todo aquello que se ha ido cocinando durante la realización de esta tesis.

VICENTE ha sido compañero, jefe y, sobre todo, amigo. Sin tu ayuda ni tu confianza este trabajo nunca habría podido ser llevado a cabo y yo no me encontraría hoy ante este tribunal.

Nunca agradeceré lo suficiente todo el amor que *ROSA* ha vertido en esta tesis, aunque ella diga que no. Gracias, cariño mío, porque sin tu apoyo y tu ánimo nunca habría podido terminarla.

MANOLI y *JAVIER*, mis padres, que siempre confiaron en mí y en mi capacidad. Nunca podré agradecerlos lo suficiente todo lo que habéis hecho por mí. Gracias desde lo más hondo de mi corazón.

A *MI FAMILIA POLÍTICA*, por todo el apoyo, el cariño, el ánimo y el trabajo que han puesto en esta tesis. Habéis sido mis padres y hermanos cuando los míos estaban tan lejos.

ALBERTO, contigo compartí nuestros cuatro años de carrera, los años de tesis doctoral y tantas, tantas, tantas vivencias, emociones y experiencias. Eres mi mejor amigo y me conoces mejor que yo mismo. Gracias por tu amistad, tu ayuda y tu buen humor. Gracias por estar siempre ahí.

EMMA, siempre agradeceré los momentos que hemos pasado juntos. Has sido amiga y confidente, poniendo siempre al mal tiempo buena cara.

No podría olvidarme de *AMÉRICA*. Ella fue la primera persona que me dio acogida. Aún con lo pedante y pesado que pudiera haber sido siempre reíamos juntos. Gracias por tan buenos ratos, tantas risas, tantas confianzas y tantas descontaminaciones (paaaaaajariiiiiiiiitos alrededorooooooooor...).

A las chicas de Inés, *MARIA, ANA, SOPHIE, LIDIA, NURIA, DIANA*, por vuestro apoyo y amistad, vuestra sonrisa cuando no os salía, vuestro oído cuando os he llamado y vuestro hombro cuando lo he necesitado. Gracias por tantas penas y alegrías compartidas.

A *CONCHI, LUDO, CHUS, DANI y JANDRO*, y a la nueva hornada, *ELENA, VICTOR, DANI y ANA*, que también han escuchado muchos problemas y han ofrecido mucho consuelo, aunque ellos no lo crean. Gracias por tantos momentos brillantes que me han hecho ver que merecía la pena (¡BORT, BORT, BORT, BORT!). Por extensión, a todos los ReVeros que me apoyaron y ayudaron en este camino.

A *DANI, LAURA, ALBERTO, TERE, JAVI y ANA*, que me ofrecieron su amistad a las claras, sin trabas y en el momento en que más lo necesitaba. Llevaré siempre aquellos recuerdos guardados en mi corazón.

A mi alter ego, *KHRAM*, por enseñarme que la verdadera fuerza no proviene de uno mismo, sino de aquellos que nos rodean. De uno mismo sólo puede venir el amor

necesario para mantenerlos a nuestro lado. “*Habéis perdido la sangre; habéis olvidado la savia*”.

A *LUIS, MIGUEL* y *ANGÉLICA*, nuestros PAS, por los buenos momentos y las ayudas. Siento ser tan pesado... pero hay que preguntar...

Al resto de becarios/as que han pasado por el departamento: *OSCAR, CÉSAR, MARTA, SUSANA, JESÚS, LEIRE, BEATRIZ, ANA BELEN, SANDRA* y tantos que me dejo en el tintero. La unión hace la fuerza.

Al personal del animalario central de la Universidad le agradezco toda la paciencia y la ayuda que me han prestado a la hora de operar, pinchar y sacrificar a las ratillas, además de su apoyo y su ánimo.

A los supervisores de la instalación radiactiva tengo que agradecerles la infinita paciencia y sus enseñanzas. Aunque en algunos momentos haya tenido que oír: “¿Pero tengo que levantarme?”

A todos los que habéis tenido algo que ver con esta tesis, a todos los que he conocido a lo largo de todos estos años: *SUSANA, MARISA, SANDRA, ANA, RAFI*, y muchos, muchos otros que aunque no estén aquí mencionados han puesto su granito de arena y han colaborado de una u otra manera. Gracias a todos.

LISTA DE ABREVIATURAS

5'-UTR:	región terminal 5' no traducida.
AC:	adenilato ciclasa.
ACF:	adyuvante completo de Freund.
ACTH:	corticotropina.
AMPc:	adenosín-5'-monofosfato cíclico.
Arg:	arginina.
ADNc:	ácido ribonucleico copia.
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero.
ATP:	adenosín-5'-trifosfato.
BHE:	barrera hematoencefálica.
BSA:	albúmina sérica bovina.
Ca ²⁺ :	ión calcio.
CBP:	proteína fijadora de CREB.
CK:	creatina quinasa.
CNPasa:	2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa.
CP:	creatina fosfato.
CPO:	células precursoras de los oligodendrocitos.
CRE:	elemento de respuesta al adenosín monofosfato cíclico.
CREB:	elemento de respuesta a CRE.
CRH:	hormona liberadora de corticotropina.
CHO-K1:	células K1 de ovario de hámster chino.
DAG:	diacilglicerol.
EAE:	encefalomielitis autoinmune experimental.
EDTA:	ácido etilendiaminotetracético.
EM:	esclerosis múltiple.
eNOS:	óxido nítrico sintasa endotelial.
ERE:	elemento de respuesta a estrógenos.
ERO:	especies reactivas de oxígeno.
ESM:	error estándar de la media.
FK:	forskolina.
GC:	guanilato ciclasa.
GDP:	guanosín-5'-difosfato.

GH:	hormona del crecimiento.
GM-CSF:	factor estimulador de colonias macrófago-granulocito.
GMPC:	guanosín-5'-monofosfato cíclico.
GPCR:	receptor acoplado a proteínas G.
GRE:	elemento de respuesta a glucocorticoides.
GRK:	quinasa de los receptores acoplados a proteínas G.
GTP:	guanosín-5'-trifosfato.
HEPES:	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'etanosulfónico.
HLA:	complejo mayor de histocompatibilidad humano.
IBMX:	isobutylmetilxantina.
IFN:	interferón.
IGF:	factor de crecimiento similar a insulina.
IgG:	inmunoglobulina tipo G.
IgM:	inmunoglobulina tipo M.
IL:	interleuquina.
iNOS:	óxido nítrico sintasa inducible.
i.p.:	intraperitoneal.
IP ₃ :	inositol 1,4,5-trifosfato.
K ⁺ :	ión potasio.
kb:	kilobases.
kDa:	kilodalton.
LCR:	líquido cefalorraquídeo.
LT:	linfotoxina.
Lys:	lisina.
MAG:	glicoproteína asociada a mielina.
MAPK:	proteína quinasa activada por mitógenos.
MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad.
MOBP:	proteína mielínica básica asociada a oligodendrocitos.
MOG:	glicoproteína de mielina del oligodendrocito.
NAC:	N-acetil-L-cisteína.
NAE:	N-acil-etanolamina.
NAPE:	fosfolípido de N-acil-etanolamina.
NGF:	factor de crecimiento nervioso.
nNOS:	óxido nítrico sintasa neuronal.

NO:	óxido nítrico.
NOS:	óxido nítrico sintasa.
OSP:	glicoproteína específica de oligodendrocitos.
PBM:	proteína básica de mielina.
PC:	proteína convertasa.
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa.
PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PE:	fosfatidiletanolamina.
PEA:	fosfato de etanolamina.
PIP ₂ :	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.
PKA:	proteína quinasa dependiente de AMPc.
PKC:	proteína quinasa C.
PLA ₂ :	fosfolipasa A ₂ .
PLC:	fosfolipasa C.
PLP:	proteína proteolipídica.
PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PTP:	fosfotirosina fosfatasa.
PTX:	toxina pertusis.
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción.
SFB:	suero fetal bovino.
SNC:	sistema nervioso central.
SRIF:	somatostatina.
SRIF-IR:	somatostatina inmunorreactiva.
sst:	receptor de somatostatina.
TEA:	trietanolamina.
TGF:	factor de crecimiento transformante.
TNF:	factor de necrosis tumoral.
TRE:	elemento de respuesta a hormonas tiroideas.
TRH:	hormona liberadora de tirotrópina.
TrkA:	receptor con actividad tirosina quinasa tipo A.
TSH:	hormona estimuladora del tiroides.

Índice

Índice

Introducción

<u>I. ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL</u>	<u>3</u>
A. MODELO DE LA PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	3
B. ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL COMO MODELO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE	7
1. Histopatología de la EAE.....	9
2. Estrés oxidativo en la EAE	11
3. Sistemas de neurotransmisión alterados en la EAE.....	13
3.1. Receptores de adenosina.....	13
3.2. Receptores de cannabinoides.....	14
3.3. Receptores del factor de crecimiento nervioso (NGF)	15
C. TRATAMIENTOS POTENCIALES PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE	17
1. Tratamientos dirigidos contra el sistema inmune	17
2. Tratamientos dirigidos hacia la remielinización	20
3. Tratamientos enfocados hacia la disminución del estrés oxidativo	22
4. Sal de calcio, magnesio y potasio de fosfato de etanolamina	23
<u>II. SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO</u>	<u>26</u>
A. SOMATOSTATINA	26
1. Descubrimiento de la somatostatina	26
2. Estructura y biosíntesis de la somatostatina	26
3. Localización de la somatostatina.....	31
<i>a. Distribución en el SNC.....</i>	<i>31</i>
4. Acciones fisiológicas de la somatostatina.....	33
B. RECEPTORES DE SOMATOSTATINA.....	34
1. Estructura de los receptores de somatostatina	35
2. Estructura de los genes de los receptores de somatostatina	37
3. Características farmacológicas de los receptores de somatostatina	38
4. Regulación de los receptores de somatostatina.....	39
<i>a. Regulación dependiente de agonista.....</i>	<i>39</i>

<i>b. Regulación de la expresión de los receptores de somatostatina</i>	<i>40</i>
5. Localización de los receptores de somatostatina	41
<i>a. Sistema nervioso central.....</i>	<i>42</i>
<i>b. Tejidos periféricos.....</i>	<i>43</i>
C. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACOPLADOS A LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA	45
1. Proteínas G	45
2. Efectores	46
<i>a. Adenilato ciclasa.....</i>	<i>46</i>
<i>b. Canales de potasio</i>	<i>49</i>
<i>c. Canales de calcio</i>	<i>50</i>
<i>d. Vesículas de secreción</i>	<i>51</i>
<i>e. Fosfotirosina fosfatasas.....</i>	<i>51</i>
<i>f. Proteínas quinasas activadas por mitógenos.....</i>	<i>53</i>
<i>g. Bomba de Na⁺/H⁺</i>	<i>55</i>
<i>h. Fosfolipasa C.....</i>	<i>55</i>
D. SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO Y SISTEMA INMUNE	58
1. Células inmunes productoras de SRIF	58
2. Receptores de somatostatina en células inmunes	59
3. Efectos de la somatostatina sobre el sistema inmune	61
<i>a. Inhibición de la proliferación de linfocitos</i>	<i>62</i>
<i>b. Efectos de la somatostatina sobre la función de los linfocitos T.....</i>	<i>63</i>
<i>c. Efectos de la somatostatina sobre la función de los linfocitos B.....</i>	<i>63</i>
<i>d. Efectos de la somatostatina sobre la función de monocitos y macrófagos.....</i>	<i>64</i>
<i>e. Efectos de la somatostatina en enfermedades inflamatorias crónicas ..</i>	<i>65</i>

Objetivos

Materiales y Métodos

<u>I. REACTIVOS</u>	<u>77</u>
<u>II. ANIMALES Y MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN</u>	<u>81</u>
A. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	81
B. MODELOS EXPERIMENTALES	81

1. Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental aguda.....	81
2. Tratamiento con fosfato de etanolamina.....	81
<u>III. EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DEL CEREBRO.....</u>	82
A. EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO.....	82
B. DISECCIÓN DEL CEREBRO.....	83
<u>IV. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA INFLAMACIÓN PRESENTE EN TEJIDO CEREBRAL DE RATA.....</u>	84
A. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	84
B. MÉTODO.....	84
<u>V. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS CELULARES.....</u>	84
<u>VI. MARCAJE DE TYR¹¹-SOMATOSTATINA-14 CON ¹²⁵INA.....</u>	85
A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	85
B. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA.....	86
C. MARCAJE.....	86
D. PURIFICACIÓN.....	86
E. TEST DE ADSORCIÓN A TALCO.....	87
<u>VII. ENSAYO DE UNIÓN DE LA SOMATOSTATINA A SUS RECEPTORES EN MEMBRANAS DE CORTEZA FRONTAL, HIPOCAMPO Y ESTRIADO.....</u>	88
A. REACTIVOS.....	88
B. MÉTODO.....	88
<u>VIII. INMUNODETECCIÓN DE LOS SUBTIPOS DE RECEPTORES DE SOMATOSTATINA.....</u>	89
A. REACTIVOS.....	89
B. MÉTODO.....	90
1. Preparación de los geles.....	90
2. Preparación de las muestras.....	90
3. Electroforesis.....	91
4. Transferencia.....	91
5. Inmunoblot.....	91
<u>IX. CUANTIFICACIÓN DEL ARNM DEL RECEPTOR DE SOMATOSTATINA sst2.....</u>	91

A. REACTIVOS	91
B. MÉTODO.....	92
1. Extracción de ARN.....	92
2. Digestión con ADNasa y precipitación del ARN.....	93
3. Transcripción inversa y PCR a tiempo real.....	93
<u>X. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA.....</u>	94
A. REACTIVOS	94
B. CURVA ESTÁNDAR DE AMPc	96
C. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA A.....	97
D. TITULACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA A.....	98
E. MÉTODO.....	99
<u>XI. INMUNODETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD αi DE LAS</u>	
<u>PROTEÍNAS G</u>	100
A. REACTIVOS	100
B. MÉTODO.....	100
1. Inmunoblot.....	100
<u>XII. INMUNODETECCIÓN DE LAS QUINASAS DE</u>	
<u>RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GRK).....</u>	101
A. REACTIVOS	101
B. MÉTODO.....	101
1. Inmunoblot.....	101
<u>XIII. INMUNODETECCIÓN DE P-CREB.....</u>	102
A. REACTIVOS	102
1. Para la obtención de muestras.....	102
2. Para el inmunoblot	102
B. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	102
C. MÉTODO.....	102
1. Inmunoblot.....	102
<u>XIV. DETERMINACIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR</u>	103
A. EXTRACCIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR.....	103
B. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SOMATOSTATINA TISULAR	103

1. Reactivos.....	103
2. Método	104
<u>XV. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA EN SUERO DE RATA</u>	104
A. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA	104
B. REACTIVOS	105
C. MÉTODO.....	105
<u>XVI. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IFN-γ, TNF-α E IL-1β EN EXTRACTOS CEREBRALES DE RATA.....</u>	106
A. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	106
B. MÉTODO.....	106

Resultados

<u>I. EFECTO DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL AGUDA SOBRE EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO EN LA CORTEZA FRONTAL, HIPOCAMPO Y ESTRIADO DE LA RATA.....</u>	113
A. SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD	113
B. RESPUESTA HUMORAL Y NIVELES DE CITOQUINAS EN LA EAE AGUDA	113
C. NIVELES DE SOMATOSTATINA EN LA EAE.....	115
D. ALTERACIONES DE LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA EN LA EAE.....	116
E. IMPLICACIÓN DE LAS GRKS EN LA REDUCCIÓN DEL RECEPTOR sst2	123
F. EFECTO DE LA EAE SOBRE EL EFECTOR ADENILATO CICLASA124	
G. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS Gi EN LA EAE	127
<u>II. EFECTO DE LA SAL DE CALCIO, MAGNESIO Y POTASIO DEL FOSFATO DE ETANOLAMINA SOBRE LAS ALTERACIONES DEL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO</u>	

<u>OBSERVADAS DURANTE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL</u>	<u>127</u>
A. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PEA SOBRE LA MANIFESTACIÓN DE LA EAE.....	128
B. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PEA SOBRE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA A PBM	129
C. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	132
D. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL PEA SOBRE LOS NIVELES DE SOMATOSTATINA	132
E. EFECTO DEL PEA SOBRE EL SISTEMA RECEPTOR-EFECTOR DE LA SOMATOSTATINA.....	133
F. PAPEL DE LAS GRKS EN LA EAE	143
G. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PEA SOBRE LA ACTIVIDAD AC.....	143

Discusión

<u>I. EFECTOS DE LA EAE AGUDA SOBRE EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO CEREBRAL DE LA RATA.....</u>	<u>152</u>
<u>II. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON LA SAL DE CALCIO, MAGNESIO Y POTASIO DE PEA.....</u>	<u>159</u>

Conclusiones

Artículos publicados

<u>ARTÍCULOS PUBLICADOS</u>	<u>175</u>
------------------------------------------	-------------------

Bibliografía

Introducción

Primeros en entrar, últimos en salir

Abrasapuentes, lema. 9º pelotón, 2º ejército, Imperio de Malaz



I. ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

A pesar de que han transcurrido ya 100 años desde que Charcot, Carswell y Cruveilhier describieran por primera vez las características anatomopatológicas y clínicas de la esclerosis múltiple (EM) (Compston y col., 1998), en el momento actual se desconoce su patogenia y cómo prevenir su progresión (Noseworthy, 1999). La EM es una enfermedad neuroinflamatoria crónica y desmielinizante de origen autoinmune (Martín y col., 1992; Steinman, 1996) que comienza normalmente en la edad adulta temprana y cuyo pronóstico es variable. El 30% de los casos presentarán una sintomatología más grave si la enfermedad aparece alrededor de los 16 a 20 años (Noseworthy, 1999), mientras que solo el 13% desarrollarán los síntomas más severos si la EM comienza entre los 30 a 45 años. El 50% de los pacientes con EM necesitarán ayuda para caminar en los primeros 15 años después del diagnóstico de la enfermedad (Weinshenker y col., 1989). En el mundo occidental, la EM es la causa no traumática de invalidez más frecuente en el adulto joven, con un coste para la sociedad de varios millones de dólares anuales. Según estudios recientes, la prevalencia de la EM en España se sitúa en torno a 60 casos por 100.000 habitantes.

A. MODELO DE LA PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La característica principal de la EM es la aparición de placas desmielinizadas en el sistema nervioso central (SNC) humano. Estas placas, que son claramente visibles utilizando técnicas radiológicas, son la expresión de una pérdida de mielina y muerte celular y suelen localizarse en zonas perivenulares, facilitando así el acceso de células inmunes autorreactivas (Compston y Coles, 2002). Aunque se desconoce la base molecular precisa de este tipo de lesiones presentes en la EM, diversos investigadores han propuesto el siguiente modelo (Fig.1). En sangre periférica, los macrófagos, a través de la presentación de autoantígenos, moléculas endógenas capaces de generar una respuesta inmune, activan a los linfocitos T cooperadores (Th). La célula Th activada libera interferón gamma (IFN- γ), el cual induce un aumento del número de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) clase II en la superficie de los



macrófagos, facilitando así la presentación del autoantígeno y la activación de más células Th. Las metaloproteasas de la matriz, que también son liberadas, alteran la barrera hematoencefálica, permitiendo la entrada de las células T activadas al sistema nervioso central (SNC). El IFN- γ y otras citoquinas secretadas por las células Th inhiben la proliferación de las células T supresoras que disminuyen la autoinmunidad (McDonnell y Hawkins, 2002). Por otro lado, el IFN- γ también aumenta el número de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BHE) (Espejo y col., 2002). Esto facilita la migración de las células Th activadas que invaden el SNC y se unen a las células presentadoras de antígeno propias del SNC, astrocitos y macrófagos. La liberación posterior del IFN- γ vuelve a causar un aumento de las moléculas HLA clase II que facilita la presentación del autoantígeno y, por lo tanto, la unión de las células Th a las células presentadoras de antígeno. Esto conduce a una activación de los macrófagos y a la proliferación de células T citotóxicas. Los macrófagos activados liberan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual ataca a los oligodendrocitos de la vaina de mielina. La linfotoxina liberada por las células T citotóxicas también daña los oligodendrocitos.

Se postula que una desmielinización adicional podría estar mediada por anticuerpos secretados por células B activas presentes en las lesiones de la EM estimuladas por citoquinas, adenosina y TNF- α (Villarroya y col., 1997; Medina-Holgado y col., 1998; Bitsch y col., 2000; Steinman y col., 2002; Neuhaus y col., 2003). En la EAE, se ha observado que la administración de anticuerpos anti- glicoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG) exacerba la enfermedad (Linnington y Lassmann, 1987; Schluesener y col., 1987; Raine y col. 1999). Los mecanismos precisos por los que dichos anticuerpos destruyen las proteínas de la mielina no se conocen aún, aunque se han propuesto numerosos modelos (De March y col., 2003). Se ha sugerido que la diana principal de estos autoanticuerpos podría ser la MOG, ya que se encuentra una mayor concentración de anticuerpos anti-MOG y una mayor densidad de células B MOG-reactivas en pacientes de EM que anticuerpos y células B dirigidas contra otras proteínas de mielina. Se ha comprobado también que estas células autoinmunes responden a la proteína completa así como a epítomos de MOG, tales como la MOG₂₅₋₃₅, y a MOG recombinante (Dharmasaroja, 2003), lo que hace pensar que la aparición de estas células B autorreactivas son el resultado de una respuesta a componentes antigénicos ambientales

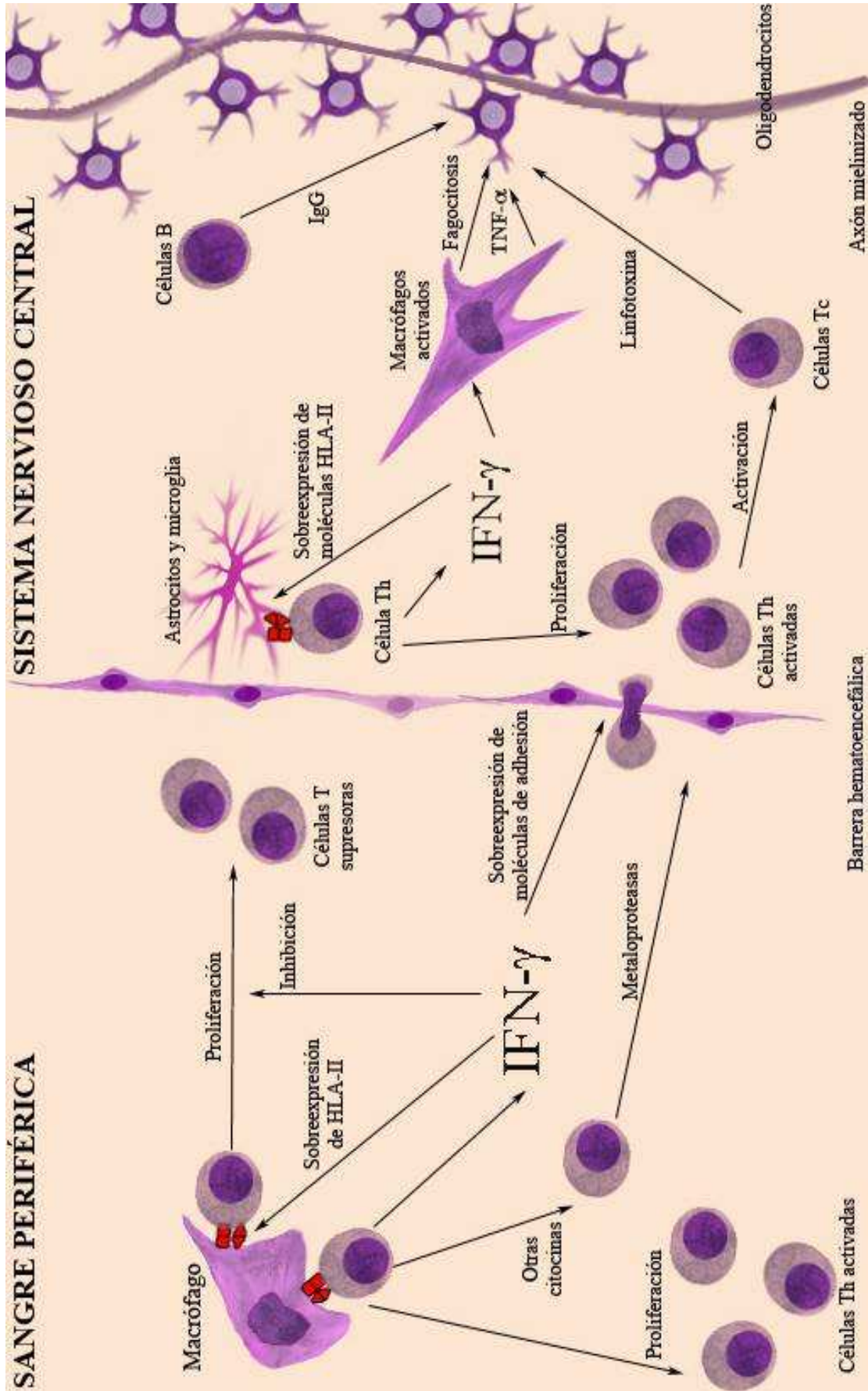


Figura 1. Modelo propuesto de la patogenia de la esclerosis múltiple



que comparten regiones epitópicas con la MOG. El isotipo más abundante de estos anticuerpos anti-MOG es la IgM. Estas inmunoglobulinas anti-MOG son capaces de unirse hasta a 7 epítomos distintos dependiendo del individuo, y el mismo anticuerpo es capaz de reaccionar con distintos epítomos con mayor o menor especificidad (Dharmasaroja, 2003). Estas inmunoglobulinas podrían ser la causa de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos que se encuentran en las placas desmielinizadas. Se han detectado dichos autoanticuerpos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM, tanto en forma libre como unidos a residuos de mielina desprendidos de las lesiones activas.

Otras proteínas de la mielina, como la proteína básica de mielina (PBM) y la proteína proteolipídica (PLP), también podrían actuar como dianas de estos autoanticuerpos (Dharmasaroja, 2003). Los autoanticuerpos dirigidos contra la PBM atraen principalmente a células T proinflamatorias, que iniciarían el ataque a la barrera hematoencefálica para volverla más permeable, mientras que los que se dirigen contra la MOG atraen a linfocitos T citotóxicos (CD8⁺ o NK), ya que provocan la destrucción de los oligodendrocitos (Genain y col., 1995). Por consiguiente, cobra fuerza la hipótesis de que estas células T autoinmunes inician el ataque a la barrera hematoencefálica para alterar su permeabilidad e iniciar la inflamación. En pacientes con EM progresiva, la cantidad de los autoanticuerpos anti-PBM en forma unida es mucho mayor, así como también es mayor la presencia de mielina libre en el LCR de estos pacientes (Warren y Catz, 1987). Los anticuerpos anti-PBM en forma libre purificados a partir del LCR de pacientes de EM progresiva reaccionan preferentemente con el epítomo 61-106 de la PBM, mientras que los anticuerpos anti-PBM en forma unida reconocen un epítomo más restringido, el 75-106 (Warren y Catz, 1993; Warren y Catz, 1994).

Es posible que los autoanticuerpos puedan producir desmielinización por sí solos mediante la activación del complemento, llevando a la muerte celular (Dharmasaroja, 2003). Así, se han podido encontrar depósitos de complemento en las zonas de las lesiones activas (Storch y col., 1998).

Aunque la EM se considera una enfermedad que afecta predominantemente a la sustancia blanca del SNC humano (Prineas, 1985), también se han detectado lesiones en la sustancia gris que, de forma similar a las placas de la sustancia blanca, se producen en áreas determinadas y bien delimitadas (Lumsden, 1970). Dado que los axones que



discurren por la sustancia gris del SNC están mielinizados, es lógico pensar que dicha sustancia tenga cierta implicación en el proceso de la enfermedad (Kutzelnigg y Lassmann, 2005). Estas lesiones tienden a pasar más desapercibidas que las que se localizan en la sustancia blanca debido a la técnica de contraste utilizada y por ello, durante años, se prestó menos atención a las mismas (Kutzelnigg y Lassmann, 2005). Sin embargo, la aparición de pruebas de pérdida neuronal y daño axonal en la EM llevó a un replanteamiento de la patogenia de esta enfermedad (Trapp y col., 1998). Por consiguiente, la sustancia gris se ha convertido en un nuevo objeto de estudio, tanto para neurorradiólogos como para neuropatólogos (Peterson y col., 2001).

Asociadas a las áreas en las que se encuentran las placas desmielinizadas, se ha detectado una atrofia cerebral y un aumento de la apoptosis neuronal (Chard y col., 2002; Dalton y col., 2002). Existen evidencias de que la desaparición de la mielina en la zona de la placa deja expuestos los elementos de la sustancia gris al ataque de linfocitos, macrófagos y sustancias citotóxicas que acarrearían la destrucción de axones, dendritas y la apoptosis neuronal observada en los pacientes con EM (Kutzelnigg y Lassmann, 2005). Es posible que la linfoxina, el TNF- α o el IFN- γ , que están aumentados en las zonas de las placas desmielinizadas, estén atacando a las neuronas del mismo modo que atacan a los oligodendrocitos. Dichas moléculas desencadenarían la activación de un proceso apoptótico en las neuronas, causando la atrofia cerebral señalada por Dalton y col. (2002).

B. ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL COMO MODELO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Se han utilizado tradicionalmente varios modelos animales de EM para el estudio de las bases moleculares de esta enfermedad. Los más comunes son aquellos basados en la inducción tanto pasiva como activa de la enfermedad y se conocen como encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Aunque la EAE se caracteriza por una escasa desmielinización, existen zonas de desmielinización localizadas cuyo origen, al igual que en la EM, no está claro. Cuando el modelo de EAE se induce por transferencia pasiva de células T autorreactivas, la inflamación del SNC se acompaña de una



desmielinización muy escasa, a pesar de la producción local de citoquinas potencialmente mielintóxicas y de la alteración de la BHE.

Los estudios sobre la EAE se realizaron inicialmente en monos (Rivers y col., 1933; Rivers y Schwentker, 1935) pero, posteriormente, se extendió el uso de roedores, cobayas y conejos (Zamvil y Steinman, 1990; Weller, 1991). No obstante, no todas las especies son igualmente susceptibles a la inducción de la EAE. Los mecanismos responsables de estas diferencias se suelen atribuir a la dotación genética de la cepa y a los polimorfismos existentes en los antígenos del MHC-II y del receptor de células T (TCR) (Zamvil y Steinman, 1990; Dahlaman y col., 1999; Roth y col., 1999). Las hormonas también se han considerado como factores importantes en la regulación de la susceptibilidad a la inducción de la enfermedad. Así, se ha descrito que la rata Lewis, una cepa altamente susceptible a la inducción de la EAE, tiene una hipofunción del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en comparación con otras cepas, como la rata Wistar (Sternberg y col., 1989; Sternberg y col., 1990). Además, se ha demostrado que son necesarios niveles elevados de corticosteroides para la remisión de la enfermedad (Mason y col., 1990) y que el tratamiento con fármacos anti-glucocorticoideos empeora la EAE en ratas Lewis (Bolton y Flower, 1989).

Inicialmente, se utilizó un homogenado de médula espinal para la inducción activa de la EAE (Kabat y col., 1947). Con el avance de las técnicas de purificación de proteínas, se extendió el uso de proteínas purificadas de mielina como la MBP, la PLP, o la MOG (Gardinier y col., 1992; Pender, 1995). Más recientemente, se ha descrito la inducción de EAE con otras proteínas relacionadas con la mielina como la proteína mielínica básica asociada a los oligodendrocitos (MOBP) (Holz y col., 2000; Kaye y col., 2000; Maatta y col., 1998), la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (Morris-Downes y col., 2002; Weerth y col., 1999), la glicoproteína específica de los oligodendrocitos (OSP) (Morris-Downes y col., 2002; Zhong y col., 2000; Stevens y col., 1999) y la 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) (Morris-Downes y col., 2002; Maatta y col., 1998), presente en los oligodendrocitos. En estos estudios, se han utilizado tanto las proteínas completas como los péptidos encefalitogénicos de éstas. La utilización de péptidos ha permitido que los modelos sean más reproducibles y que especies que eran resistentes a la inmunización con la proteína completa sean susceptibles



a la misma con determinados péptidos. Las posibles combinaciones tanto de especies como de antígenos dan lugar a un abanico de modelos diferentes de EAE.

Tras la inmunización activa con antígenos de la mielina o la transferencia de células T encefalitogénicas, se desarrolla la respuesta inmune contra el antígeno presente en el SNC y los animales desarrollan los signos clínicos característicos de la EAE. La aparición de los signos clínicos suele ir precedida de un descenso del peso corporal que se mantiene hasta que el animal se estabiliza o se recupera de éstos. Los signos clínicos de la EAE consisten en el desarrollo de una parálisis ascendente, que se inicia con flacidez de la cola y que progresa provocando una paraparesia o paraplejia de los miembros posteriores, pudiendo llegar a grados de tetraplejia e incluso, en algunos casos, provocar la muerte del animal.

En base al curso clínico de la enfermedad, se pueden distinguir diferentes tipos de EAE: EAE aguda, EAE crónica remitente-recurrente y EAE crónica progresiva. La EAE aguda se caracteriza por la aparición de un único episodio clínico de la enfermedad. Las especies idóneas para este modelo son la rata Lewis y la rata Dark Agouti, que son cepas muy susceptibles, y el antígeno más utilizado es la MBP (Stepaniak y col., 1997; Lenz y col., 1999). En la EAE crónica remitente-recurrente, por el contrario, se pueden observar dos o más brotes clínicos de la enfermedad. Para este modelo, se utilizan habitualmente ratones SJL inmunizados con PLP, aunque también se han utilizado ratas (Raine, 1985; Polman y col., 1988). Por último, la EAE crónica progresiva sigue un curso progresivo sin brotes y se ha descrito en ratones con dotación genética H-2b, en ratas inmunizadas con MOG (Mendel y col., 1995; Weissert y col., 1998), y en ratones H-2u inmunizados con MBP (Acha-Orbea y col., 1988; Wraith y col., 1989).

1. Histopatología de la EAE

Los diferentes modelos de EAE reproducen la mayoría de las características histopatológicas de la EM. En el SNC de los animales con EAE, se observan infiltrados inflamatorios perivasculares y parenquimatosos constituidos principalmente por linfocitos y macrófagos que han atravesado la BHE (Lassmann y col., 1980; Polman y col., 1986; Pender, 1987). Posteriormente, se produce la activación de células residentes como la microglia y los astrocitos (Wekerle y col., 1987; Lassmann y col., 1993). En función de la



especie y/o cepa animal y del antígeno utilizado, las lesiones inflamatorias pueden ir acompañadas o no de áreas de desmielinización. Mientras que el modelo agudo de EAE en la rata Lewis inmunizada con MBP se caracteriza por una desmielinización leve, en el modelo de ratón SJL inmunizado con PLP y en el de ratón C57BL/6 inmunizado con MOG se observa una mayor desmielinización, siendo más prominente y extensa en el último. No está claro cuál es el componente de la lesión que provoca la aparición de los signos clínicos. Se ha descrito que la formación del edema podría ser una de las principales causas de los signos neuropatológicos que se desarrollan (Simmons y col., 1982; Kerlero de Rosbo y col., 1985). Los fallos en la conducción nerviosa que conlleva la desmielinización también podrían estar implicados (Pender, 1987). En la EAE, al igual que sucede en la EM, se observa daño y pérdida axonal (Raine y col., 1984; Raine y Cross, 1989; Kornek y col., 2000) que podría ser el principal responsable de la discapacidad neurológica permanente (Wujek y col., 2002).

El modelo de EAE ha permitido el estudio de las respuestas inmunitarias implicadas en la patogenia de la EM. Así, se ha estudiado la contribución de cada subpoblación celular del sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad, así como los mecanismos implicados en la entrada de estas células al SNC y las células o mediadores solubles responsables del proceso de desmielinización.

Igual que sucede para la enfermedad humana, la EAE no se puede considerar una enfermedad exclusivamente provocada por células Th1, aunque mayoritariamente estaría mediada por éstas y por las citoquinas que secretan, como el IFN- γ , TNF- α , linfoxina y la IL-2 (Constantinescu y col., 1998). El IFN- γ y el TNF- α activan a los macrófagos y éstos tienen la capacidad de destruir la mielina y los oligodendrocitos, así como de producir más citoquinas, IL-12, IL-23 y TNF- α , y productos citotóxicos como el NO que también actuarán contra esas dianas. Se ha descrito que los linfocitos Th2 también participan en la inducción y propagación de la enfermedad (Lafaille y col., 1997). Se ha observado, además, que se puede inducir la EAE mediante la inmunización pasiva con células T CD8⁺ específicas frente a la MBP (Sun y col., 2001) y que estas células son abundantes en las lesiones de la EM (Kuhlmann y col., 2002). Los linfocitos T CD8⁺ pueden causar apoptosis mediante la expresión de FasL, que se unirá a su receptor Fas en la superficie de los oligodendrocitos. Estos linfocitos secretan enzimas como la perforina y la granzima que pueden destruir la célula diana.



La respuesta inflamatoria es la reacción más característica de la EM y la EAE (Hallevorden, 1940) y su evolución implica distintos pasos. En la EAE, los primeros infiltrados de células proinflamatorias se detectan en los cinco primeros días posteriores a la inmunización (Waksman y Adams, 1960). La extensión de la zona de inflamación aumenta gradualmente con el tiempo, alcanzando su mayor extensión en los primeros días de la aparición de los signos clínicos (Waksman y Adams, 1960). En los animales menos afectados por la EAE aguda, las lesiones inflamatorias permanecen confinadas en las meninges de la médula espinal, alrededor de pequeñas venas en las anastomosis de los vasos meníngeos. Sin embargo, en los animales con EAE aguda severa, la inflamación se extiende por todo el SNC, encontrándose cambios estructurales tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca (Lanssmann., 1983). De forma similar, en la EAE crónica progresiva y EAE crónica remitente-recurrente los infiltrados inflamatorios iniciales pueden encontrarse, en distinta intensidad, en los primeros siete días tras la inmunización, independientemente de la presencia o ausencia de un episodio agudo posterior (Wisniewski y Keith, 1977; Grunde-Iqbal y col., 1980).

En la rata Lewis, la EAE aguda es una enfermedad cuyos signos clínicos y anomalías histopatológicas remiten tras un periodo de tiempo concreto. No se comprende aún el mecanismo que limita el curso de la EAE, o qué le ocurre a la población de células T efectoras. No obstante, la apoptosis parece jugar un papel muy importante en la eliminación de las células infiltradas en el SNC (Pender y col., 1991; Schmied y col., 1993).

2. Estrés oxidativo en la EAE

Los datos obtenidos de diversos estudios sugieren que los radicales libres de oxígeno y de nitrógeno podrían desempeñar un papel importante en la patogenia de la EAE y de la EM. Dichos radicales libres, generados sobre todo por macrófagos, han sido implicados en los procesos de daño axonal y desmielinización de ambas patologías (Koprowski y col., 1993; Bo y col., 1994; Van der Goes y col., 1998). Además, se ha demostrado que pueden provocar la activación de ciertos factores de transcripción que estimulan la expresión de muchos genes implicados en la EAE y la EM, como los del TNF- α , la óxido nítrico sintasa (NOS) o las moléculas de adhesión celular (Barnes y Karin, 1997; Winyard y Blake., 1997). La actividad de las metaloproteasas de matriz, de gran importancia para la migración de las células T hacia el SNC, también está implicada



en la patogenia de dichas enfermedades (Romanic y Madri, 1994; Leppert y col., 1995; Merrill y Murphy, 1997). Estas proteínas, que son una familia de endopeptidasas (Wang y Tsirka, 2005), se activan con el aumento de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) por parte de astrocitos y microglia (Haorah y col., 2007). Una vez son funcionales, las metaloproteasas de matriz provocan la ruptura de la BHE, permitiendo la entrada de células inmunes al SNC (Abilleira y col., 2003; Alvarez-Sabin y col., 2004).

Hay evidencias de una peroxidación de lípidos en el LCR y plasma de pacientes con EM (Hunter y col., 1985; Naidoo y Knapp., 1992), que aumenta en la fase activa de la enfermedad. Numerosos estudios muestran, además, un incremento en la actividad oxidativa de los radicales libres y una reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en los glóbulos rojos de dichos pacientes (Zagorski y col., 1991; Dudek y col., 1992) así como una disminución en la actividad de la glutatión peroxidasa en las placas desmielinizadas (Langemann y col., 1992).

La molécula clave en el estrés oxidativo es el peroxinitrito. La formación de este metabolito se debe a la reacción entre el óxido nítrico (NO) y las ERO, resultantes de la utilización del oxígeno en diferentes rutas metabólicas (De Duve y Baudhuin, 1966). En concreto, es consecuencia de una producción excesiva de NO. El NO es un mensajero biológico que desempeña un papel esencial en la neurofisiología; sin embargo, puede ser tanto neurotóxico como neuroprotector y es la cantidad del mismo y el ambiente biológico los que determinan su acción fisiológica o patológica (Gonsette, 2008a). En el SNC, hay tres isoformas de NOS que pueden generar NO: la NOS neuronal (nNOS), la NOS inducible (iNOS) y la NOS endotelial (eNOS). La nNOS se activa cuando hay una disfunción mitocondrial (Shin, 2001); la iNOS se localiza principalmente en macrófagos y microglia y genera altos niveles de NO durante prolongados periodos de tiempo durante la reacción inflamatoria (Dasgupta y col., 2003) mientras que la eNOS se activa cuando la BHE sufre algún daño (Wu y Tsirka, 2009).

El peroxinitrito se genera *in vivo* por la combinación de dos radicales libres: el ión superóxido y el NO (Beckman y col., 1990). El peroxinitrito se protona rápidamente a ácido peroxinitroso que se metaboliza en dióxido de nitrógeno y radical hidroxilo. En su mayor parte, éstos se vuelven a combinar para formar nitrato, pero el 30% se utiliza en la formación del peroxinitrito altamente tóxico. En el ambiente biológico, debido a la alta



concentración del par bicarbonato/dióxido de carbono, el peroxinitrito reacciona rápidamente con el dióxido de carbono para formar dióxido de nitrógeno y radicales carbonato, dos oxidantes fuertes (Augusto y col., 2002). Estos compuestos secundarios son los que causan los mecanismos patológicos del peroxinitrito. En concreto, el dióxido de carbono se une a residuos de tirosina, provocando la oxidación de las mismas (Gonsette, 2008b).

Se ha comprobado la presencia de peroxinitrito en las lesiones de la EM (Cross y col., 1998; Oleszak y col., 1998; Liu y col., 2001). Tanto en las lesiones activas agudas como en las crónicas, se han detectado células positivas en nitrotirosina (Hill y col., 2004). En la EAE, el peroxinitrito se forma en etapas muy tempranas de la enfermedad y se correlaciona con la actividad de la misma, no pudiéndose detectar durante las remisiones y las fases crónicas silenciosas (van der Veen y col., 1997). El papel predominantemente patogénico del peroxinitrito en la EAE se ha demostrado tras inyectar, a ratones con EAE, un catalizador de peroxinitrito que neutraliza de forma específica la actividad del mismo sin afectar a los mecanismos mediados por el NO (Cross y col., 2000). Dicha inyección provocó una reducción en la incidencia y gravedad de los síntomas y en las reacciones inflamatorias, en comparación con los animales con EAE sin tratar. Hay que destacar, además, que los oligodendrocitos maduros son especialmente sensibles al daño por peroxinitrito, a pesar de su relativa resistencia a la toxicidad mediada directamente por el NO (Jack y col., 2004). En ratas, el peroxinitrito causa una destrucción de la mielina similar a la que se da en las lesiones de la EM (Touil y col., 2001). Por otro lado, el peroxinitrito media la toxicidad microglial hacia los oligodendrocitos (Li y col., 2005). Se ha demostrado que, durante la maduración, los oligodendrocitos son susceptibles a los ataques de los radicales libres (Bernardo y col., 2003; Baud y col., 2004). Por tanto, la toxicidad oxidativa podría jugar un papel importante no sólo en la destrucción de la mielina, sino también en contrarrestar la remielinización.

3. Sistemas de neurotransmisión alterados en la EAE

3.1. Receptores de adenosina

El nucleósido purínico adenosina regula la activación de las células inmunes y la supervivencia neuronal a través de receptores específicos acoplados a proteínas G que se



expresan en macrófagos y neuronas, denominados A1, A2A, A2B y A3 (Auchampach, 2007). Hay datos que sugieren que el receptor de adenosina A1 (A1AR) podría estar relacionado con el desarrollo de la EAE. Así, se ha demostrado que los ratones que carecen de dicho receptor (ratones A1AR $-/-$) y a los que se induce la EAE mediante inyección subcutánea de MOG desarrollan una forma severa y progresiva de la enfermedad en comparación con ratones que lo poseen (ratones A1AR $+/+$), en los que la enfermedad comienza a remitir a partir del vigésimo día de la inducción (Tsutsui y col., 2004). En los ratones A1AR $-/-$ inducidos, se observa una grave desmielinización, lesiones axonales y un aumento de la activación de microglia/macrófagos. Además, la médula espinal de estos ratones muestra una expresión aumentada de genes proinflamatorios durante la EAE, mientras que la expresión de los genes antiinflamatorios está inhibida en comparación con los ratones A1AR $+/+$ (Tsutsui y col., 2004). En los macrófagos de ratones A1AR $-/-$ con EAE, se ha descrito un aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias como la interleuquina-1 β (IL-1 β) y de la metaloproteínasa de la matriz subtipo 12, en comparación con los controles A1AR $+/+$ (Vos y col., 2003). Por otro lado, se ha encontrado una disminución en la densidad del A1AR en microglia de ratones A1AR $+/+$ durante la EAE, acompañada de neuroinflamación (De Stefano y col., 1998; Tsutsui y col., 2004), resultados similares a los observados en pacientes de EM. El tratamiento de estas ratas con cafeína aumenta la expresión de dichos receptores en microglia, lo cual reduce la gravedad de la EAE (Shi y col., 1993; Bona y col., 1995; Linden, 2001; Tsutsui y col., 2004), reducción que se potencia mediante el tratamiento concomitante con agonistas selectivos del A1AR. En conclusión, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el A1AR controla la extensión de la neuroinflamación y la desmielinización asociada en la EM y la EAE.

3.2. Receptores de cannabinoides

En ratas con EAE, se ha descrito una disminución del número de receptores de cannabinoides CB1, el subtipo presente preferentemente en el cerebro, así como una reducción en los niveles de ARNm de dicho receptor en los cuerpos celulares de neuronas del estriado (Berrendero y col., 2001) mientras que en la corteza cerebral, el número pero no los niveles de ARNm del receptor está disminuido (Cabranes y col., 2006). Dado que ambas áreas cerebrales están relacionadas con el control de la actividad motora (Cabranes y col., 2005), estos hallazgos sugieren que el receptor CB1 podría estar implicado directa-



o indirectamente en la expresión de algunos signos clínicos de la EAE, como la ataxia (Cabranes y col., 2006). En apoyo a esta hipótesis, hay estudios que muestran una mejoría en la capacidad motora y una reducción en la gravedad de los síntomas de la EAE cuando se emplean agonistas del receptor CB1 (Baker y col., 2000; Baker y col., 2001; Arévalo-Martin y col., 2003; Croxford y Miller, 2003). También se ha demostrado que agonistas del receptor CB1 son capaces de disminuir la secreción de mediadores inflamatorios por parte de astrocitos y microglia (Ortega Gutierrez y col., 2005a; Ortega Gutierrez y col., 2005b). Además, los ratones deficientes para el receptor CB1 a los que se induce la EAE presentan un agravamiento significativo de los síntomas de la enfermedad y del daño axonal (Pryce y col., 2003).

Por otro lado, se ha comprobado que los agonistas del subtipo de receptor de cannabinoides CB2 también conducen a una disminución en la gravedad de los síntomas de la EAE y a una remielinización en ratones (Arévalo-Martin y col., 2003). Molina-Holgado y col. (2003) demostraron que la activación del receptor CB2 inhibe la secreción de IL-12 en células microgliales de ratón. Estas células, junto con los macrófagos y las células dendríticas, responden a la neuroinflamación migrando hacia las zonas del daño tisular y aumentando su secreción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , el TNF- α y la IL-6 (Mestre y col., 2006). Carlisle y col. (2002) demostraron que la activación de estas células induce un aumento en la expresión del receptor CB2 (Carlisle y col., 2002), que podría estar implicado en la reducción de la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de la microglia.

3.3. Receptores del factor de crecimiento nervioso (NGF)

Las citoquinas que están implicadas en la inflamación y en la respuesta inmune durante la EAE, tales como la IL-1 β y el TNF- α , son potentes inductores de la síntesis del factor de crecimiento nervioso (NGF) en el SNC y en tejidos periféricos (Ebadi y col., 1997; Mamet y col., 2002). En ratas con EAE, se ha demostrado un aumento en los niveles de NGF en ciertas áreas cerebrales como el tálamo y la corteza cerebral así como un aumento de la inmunorreactividad de los receptores de NGF, como el receptor p75 y el receptor con actividad tirosina quinasa tipo A (Trk-A) (Micera y col., 1995; De Simone y col., 1996). La inmunorreactividad de dichos receptores se localiza en la pared de los vasos sanguíneos y en neuronas adyacentes, en áreas perivasculares, y en células gliales (Oderfeld Nowak y col., 2001). Por otro lado, en la médula espinal y médula oblongata,



localizaciones donde se ha encontrado el infiltrado celular inflamatorio más grave, se ha descrito una reducción del contenido de NGF. Esto podría deberse a un mayor requerimiento del NGF en las áreas cerebrales con mayor grado de inflamación (Calzá y col., 1997).

En un estudio reciente, Florenzano y Bentivoglio (2000) detectaron un número muy elevado de mastocitos en el tálamo de rata durante la EAE así como un aumento de desgranulación de dichos mastocitos. Dado que estas células sintetizan NGF, podrían ser la fuente del NGF talámico en la EAE y este mecanismo de desgranulación podría elevar el dolor central durante esta enfermedad. No obstante, también se ha considerado la posibilidad de fuentes periféricas de NGF en vista de la alteración de la BHE durante la EAE, o de un origen glial, dado que los astrocitos pueden sintetizar NGF.

En la médula espinal de ratas sanas, la astroglia de la sustancia blanca expresa tanto el receptor p75 como el TrkA mientras que en la sustancia gris solo expresa el tipo TrkA (Oderfeld-Nowak y col., 2001). Dado que el NGF está implicado en la reparación de axones, en la reorganización neuronal y en el crecimiento y diferenciación de los oligodendrocitos (Althaus y col., 1992; Aloe y Micera, 1998), se ha postulado que el NGF podría jugar un papel protector en la EAE. En apoyo a esta hipótesis, el grupo de Tafreshi (2006) demostró que la administración de NGF a ratones con EAE produce un descenso significativo en la gravedad de los síntomas de la EAE. Además, el análisis histopatológico de secciones de médula espinal procedentes de dichos ratones mostró una gran reducción en la muerte neuronal.

Oderfeld-Nowak y col. (2001) han demostrado, en médula espinal de rata, la presencia de receptores TrkA en motoneuronas de la lámina IX de Rexel así como en oligodendrocitos y astroglia. Recientemente, estos autores detectaron un aumento de la inmunorreactividad de TrkA en motoneuronas y oligodendrocitos, principalmente en la sustancia blanca y astroglia, en la fase aguda de la EAE, sin cambios en la fase crónica de la enfermedad. Estos resultados sugieren que los cambios en la expresión del receptor TrkA en neuronas y glia dependen del grado de inflamación. Además, estos datos indican que durante la fase aguda de la EAE, las células gliales se hacen más receptivas al NGF, preparándolas para responder al aumento de neurotrofinas causado por las células inflamatorias observado durante la EAE.



C. TRATAMIENTOS POTENCIALES PARA LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Aunque no existe cura para la EM, se han encontrado varios tratamientos que son eficaces en frenar el desarrollo de la enfermedad y en combatir los síntomas. En el momento actual, hay tratamientos dirigidos al control del sistema inmune, otros dirigidos a la remielinización de las placas desmielinizadas con sustancias que estimulan tanto la expresión del ARNm de las proteínas de la mielina (MBP, MOG, etc.) como la síntesis *de novo* de la vaina de mielina y tratamientos dirigidos a reducir el estrés oxidativo observado en la EM (Tabla 1).

1. Tratamientos dirigidos contra el sistema inmune

Como se ha descrito previamente, existen alteraciones graves en la respuesta inmune tanto en la EM como en la EAE (Espejo y col., 2002). Por consiguiente, la terapia dirigida contra la autoinmunidad adquirida por el paciente constituye la principal línea de investigación que podría conducir a un tratamiento eficaz de la enfermedad. Así, el tratamiento con inmunosupresores generales, como la ciclofosfamida o la mitoxantrona, se ha aplicado a los enfermos de EM. Estos tratamientos reducen las lesiones inflamatorias que se producen en la EM y pueden retrasar el progreso de la misma. No obstante, existen efectos inmunosupresores más extensos que limitan un tratamiento prolongado (Fox y Ransohoff, 2004).

Se distinguen varios tipos de inmunosupresores destinados al tratamiento de la EM: inhibidores de la calcineurina, antimetabolitos, inmunosupresores antiproliferativos, bloqueantes de la unión de ligandos a moléculas de superficie celular (ligandos de moléculas tipo CD) y supresores de citoquinas.

Uno de los inhibidores de la calcineurina ensayados es la ciclosporina A. Este compuesto no ha revelado capacidad alguna para aliviar los síntomas de la EM, aunque sí ha tenido éxito en retrasar el progreso de la enfermedad. No obstante, la utilización de la ciclosporina A conlleva nefrotoxicidad, hipertensión e hiperlipidemia, por lo que actuaciones posteriores con éste inmunosupresor o sus derivados han sido descartadas hasta encontrar una manera de evitar las consecuencias negativas del metabolismo de estas moléculas (Gonsette, 2004).

Los antimetabolitos que se han empleado tradicionalmente en el tratamiento de la EM incluyen la azatioprina y el metotrexato, que provocan una mejoría modesta en los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, los efectos secundarios que provocan dichas



moléculas, entre los que se encuentran una neurotoxicidad y fallo hepático severo, han llevado al desarrollo de otros compuestos tales como el ácido fusídico, un antibiótico de la familia de las sulfamidas derivado de la azatioprina. Éste ácido es capaz de inhibir la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-2 e IL-6. Se consigue así retrasar la aparición de la enfermedad y acortar la duración de los periodos sintomáticos, aunque estos periodos no son menos severos (Di Marco y col., 2001). El tratamiento con dicho ácido disminuye, además, la tasa de las recaídas mientras que los efectos secundarios parecen ser excepcionales (Nicoletti y col., 1999).

Por otro lado, existen inmunosupresores que inhiben la proliferación tanto de las células T como de las células B, previenen la diferenciación de los linfocitos Th1 y promueven la diferenciación de los linfocitos Th2 (Silva y Morris, 1997). Aunque se ha demostrado que presentan una efectividad excelente, estos inmunosupresores provocan pancitopenia (disminución drástica de todos los tipos celulares sanguíneos), por lo que se han descartado en la actualidad. Existen también tratamientos dirigidos a la reducción de los infiltrados inflamatorios, promoviendo la aparición de linfocitos supresores, como el micofenolato de mofetilo, que se ha utilizado asociado a la ciclosporina A en pacientes de EM que fueron sometidos a transplantes (Tran y col., 2001). Estos pacientes presentaron una reducción en la gravedad de los síntomas de la EM y un intervalo de tiempo más largo entre recaídas.

Hay moléculas con efectos terapéuticos que actúan impidiendo la formación del huso mitótico, con objeto de disminuir la división de los linfocitos T y B implicados en la patogénesis de la EM. Sin embargo, estas moléculas provocan efectos secundarios tan indeseables que las investigaciones sobre ellas se encuentran, por el momento, suspendidas (Gonsette, 2004).

Otro tipo de inmunosupresores son los que actúan sobre ligandos de superficie celular, tales como anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión y oligonucleótidos. Así, se emplean anticuerpos dirigidos contra las moléculas CD3, CD4, CD52 o CD20. Todas ellas provocan una regulación a la baja en el número de linfocitos circulantes, con mayor o menor efectividad. Sin embargo, como efectos negativos, no reducen la gravedad de los síntomas (Rumbach y col., 1996) y pueden incluso conducir al desarrollo de linfomas (Grillo-López y col., 2002).

**Tabla 1.** Estrategias terapéuticas dirigidas contra la esclerosis múltiple.

Estrategia	Tipo	Subtipo	Ejemplo
Inmunosupresión	General		Ciclofosfamida Mitoxantrona
	Dirigida a la EM	Inhibidores de calcineurina	Ciclosporina A
		Antimetabolitos	Azatioprina Metotrexato Ácido fusídico
		Antiproliferantes	Micofenolato de mofetilo
		Bloqueantes de ligandos de superficie celular	Anticuerpos monoclonales anti-CD3
	Contra citoquinas	Pepluanona Rolipram Treo sulfano Interferón β	
Remielinización	Trasplante celular		
		Activación de oligodendrocitos	PDGF
Reducción del estrés oxidativo	Enzimas		Catalasa Superóxido dismutasa
	Antioxidantes de bajo peso molecular	Secuestradores	Lazaroides N-acetil-L-cisteína
		Quelantes	Riluzole Ácido Úrico

EM: esclerosis múltiple; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Por último, existe un grupo de inmunosupresores dirigidos contra las citoquinas. Dichos fármacos alteran la relación entre las citoquinas proinflamatorias y las citoquinas anti-inflamatorias. En este sentido, algunas moléculas, como la pepluanona, actúan como inhibidoras de la secreción del TNF- α . Dichas moléculas tienen un gran efecto terapéutico en la EM, (Klinkert y col., 1997) a pesar de que en los primeros ensayos



clínicos, dos pacientes mostraron un aumento de las lesiones inflamatorias (Gonsette, 2004). Se han ensayado también compuestos que actúan sobre la IL-6 (rolipram) y la IL-12 (treosulfano). En este caso, la administración a corto plazo de dichos fármacos no previene la enfermedad, aunque sí retrasa la aparición de los síntomas. Cuando la administración se realiza a largo plazo, se suprimen los síntomas pero estos reaparecen cuando el tratamiento se interrumpe (Wang y col., 2000).

Entre los inmunosupresores dirigidos contra las citoquinas se encuentra el interferón β (IFN- β), un interferón de tipo I (Weissman y Weber, 1986) que es producido por diversos tipos celulares, tales como fibroblastos, melanocitos, macrófagos, células dendríticas o células T (Soos y Szente, 2003). Se ha utilizado el IFN- β en el tratamiento de la forma recurrente-remitente de la EM para reducir la frecuencia de las recaídas y retrasar el avance de la incapacidad física (Stübgen, 2009), y en pacientes de EM secundaria progresiva durante las fases activas de la enfermedad (Goodkin y col., 2000), reduciendo las recaídas un 30%. Sin embargo, no se ha demostrado su eficacia frente a la EM primaria (Leary y col., 2003; Montalban, 2004). Hasta la fecha, se desconocen los mecanismos por los que el IFN- β induce esta mejoría en pacientes con EM, aunque se ha sugerido que su acción inmunomoduladora es la responsable. El IFN- β es capaz de modular la secreción de citoquinas, aumentando la secreción de las citoquinas antiinflamatorias y reduciendo la síntesis de las citoquinas proinflamatorias (Huang y col., 1995; Rep y col., 1996; Karp y col., 2001). Además, se ha comprobado que bloquea la apertura de la BHE mediante la inhibición de las metaloproteasas de matriz (Hartung y Kieseier, 1996; Leppert y col., 1996; Stuve y col., 1997). Por otro lado, el IFN- β es capaz de inhibir la proliferación de las células Th y de restablecer la actividad de las células T supresoras (Clerico y col., 2007; Markowitz, 2007).

2. Tratamientos dirigidos hacia la remielinización

Una de las terapias con más posibilidades de éxito en la EM es aquella basada en promover la remielinización de las placas desmielinizadas. Para ello, existen dos estrategias principales. La primera estrategia consiste en trasplantar células con potencial reparador o capacidad mielinogénica en distintos puntos del SNC (Duncan y col., 1997; Franklin, 2002). Se ha demostrado la eficacia de este tipo de terapia en distintos modelos animales, pero aún se ha de probar su capacidad terapéutica en ensayos clínicos con



humanos (Zhao y col., 2005). La segunda estrategia consiste en activar o potenciar los mecanismos endógenos de remielinización. El objetivo es conseguir estos efectos mediante la utilización de fármacos, evitando así el uso de transplantes celulares. Sin embargo, para ello, primero hay que determinar por qué falla la remielinización, para lo cual es necesario entender los mecanismos que la median (Gensert y Goldman, 1997). Hay evidencias que indican que la capa de mielina formada tras la desmielinización no está formada por los oligodendrocitos supervivientes de un episodio de la enfermedad, sino por sus precursores, presentes en el SNC adulto (Gensert y Goldman, 1997; Keirstead y Blakemore, 1997). Cuando se produce la lesión desmielinizante, estas células proliferan y migran rápidamente para rellenar esa lesión (Levine y Reynolds, 1997). A esta primera fase se le denomina fase de reclutamiento (Zhao y col., 2005). Las células precursoras de los oligodendrocitos (CPO) se dirigen a los axones dañados para formar capas de mielina nuevas a la vez que se diferencian en oligodendrocitos maduros productores de mielina. Esta fase se conoce como fase de diferenciación (Zhao y col., 2005). Durante el desarrollo, éstas dos fases están separadas en el tiempo por distintos conjuntos de señales que producen un ambiente pro-reclutativo o un ambiente pro-diferenciativo. En el SNC adulto, las CPO constituyen una población celular estable que permanece en relativo reposo y que se divide ocasionalmente (Levine y col., 2001). La división de las CPO se produce como respuesta a un daño provocado en el SNC, incluyendo la desmielinización. En estos episodios traumáticos, se dispara la expresión de factores de transcripción específicos (Zhao y col., 2005), cuyos niveles se restablecen una vez diferenciadas en oligodendrocitos productores de mielina. Sin embargo, existen zonas desmielinizadas en cuyas proximidades se pueden encontrar estas CPO y en las que la remielinización es totalmente nula. Así, aunque el aumento de los factores de transcripción es un paso crítico para la activación de las CPO, no todas las CPO alcanzan ese punto. Una vez activadas las CPO, su número aumenta considerablemente (Carroll y Jennings, 1994). Se ha demostrado que existen múltiples mitógenos que disparan la proliferación de dichas células durante el desarrollo (Richardson, 2001) y se piensa que en el SNC adulto, existen moléculas similares que provocan el mismo efecto durante los episodios de desmielinización. Una de ellas es el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Se ha demostrado que tanto en neonatos como en situaciones que siguen a un episodio de desmielinización, los niveles de PDGF están muy elevados



(Hinks y Franklin, 1999; Van Heyningen y col., 2001). Utilizando ratones transgénicos para PDGF-A, se ha demostrado que el aumento de dicha molécula observado tras la inducción de la desmielinización va asociado a un aumento del número de CPO, por lo que éste mitógeno debe estar implicado en la proliferación de las mismas (Woodruff y col., 2004). Por consiguiente, la infusión de factores de crecimiento podría potenciar la reparación *in vivo*, siempre y cuando estén presentes las CPO.

Para crear un ambiente remielinizante, la respuesta inflamatoria juega un papel importante. Hay estudios recientes que muestran que en ausencia de citoquinas proinflamatorias, tales como la IL-1 o el TNF- α , la eficiencia de la remielinización es menor, así como en ausencia de MHC-II o de linfocitos T (Arnett y col., 2001; Bieber y col., 2003).

3. Tratamientos enfocados hacia la disminución del estrés oxidativo

Debido a la implicación del estrés oxidativo en la patogénesis de la EM, la terapia con elementos antioxidantes podría resultar efectiva. Los antioxidantes se clasifican en dos tipos: enzimáticos, tales como la catalasa o la superóxido dismutasa, y no enzimáticos o antioxidantes de bajo peso molecular (ABPM). Los ABPM, a su vez, se subdividen en antioxidantes de acción directa (secuestradores y antioxidantes de cadena) y de acción indirecta (quelantes).

Los hallazgos encontrados *in vitro* con distintas moléculas antioxidantes las han convertido en objeto de estudio como terapia en modelos experimentales. Hall (1992) demostró que moléculas que son capaces de retirar radicales de la peroxidación lipídica e inhibir la peroxidación de lípidos dependiente de hierro, tales como los lazaroides o 21-aminosteroides, son efectivas a la hora de reducir la incidencia y gravedad de la EAE. También se ha demostrado que la N-acetil-L-cisteína (NAC), capaz de aumentar los niveles intracelulares de glutatión, inhibe la inducción de la EAE. Esta protección se asocia a la potenciación de la respuesta proliferativa de linfocitos a antígenos inmunogénicos (Lehmann y col., 1994). Se ha demostrado también que la inyección de catalasa antes de la inducción de la EAE retrasa la aparición de los síntomas de esta enfermedad (Brenner y col., 1997).

Hay estudios *in vitro* que sugieren que el glutamato tiene un papel importante en la patología de la EM. Se ha demostrado que los oligodendrocitos son altamente vulnerables a la excitotoxicidad del glutamato, principalmente mediante receptores de



AMPA/kainato (Matute y col., 1997; McDonnald y col., 1998), que causa lesiones muy similares a las que se observan en las placas desmielinizadas. En pacientes de EM se ha comprobado la existencia de concentraciones elevadas de glutamato, que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Se asocia, así, la producción de glutamato por parte de los macrófagos con la muerte de los oligodendrocitos y el daño axonal observado (Stower y col., 1997; Werner y col., 2001). Una posible fuente de glutamato en el LCR es la microglia activada, especialmente abundante durante el ataque inmunológico y la inflamación (Piani y col., 1991; Noda y col., 1999). En cultivo, la microglia libera glutamato a través de un transportador inverso de glutamato, proceso potenciado en situaciones patológicas (Noda y col., 1999). Estudios recientes muestran que los tratamientos con antagonistas de AMPA/kainato provocan una mejoría significativa de los síntomas de la EAE (Noseworthy y col., 2000). Además, se consigue un aumento de la tasa de supervivencia de oligodendrocitos y una reducción del daño axonal (Pitt y col., 2000; Smith y col., 2000). El daño subsiguiente en la sustancia blanca que se produce en la médula espinal se ve también reducido tras el tratamiento con antagonistas del receptor de glutamato (Smith y col., 2000). El riluzole, un ABPM de tipo quelante, es uno de estos antagonistas. Empleado en el tratamiento contra la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), ha demostrado ser eficaz también en el tratamiento de la EAE inducida por MOG en ratones, reduciendo la pérdida axonal, la inflamación, la desmielinización y la gravedad de los síntomas (Smith y col., 1999; Gilgun-Sherki y col., 2003).

Por otro lado, varios estudios demuestran que la inhibición de la NOS inducible (iNOS) suprime la EAE en ratas (Zhao y col., 1996; Brenner y col., 1997). También se conocen los efectos beneficiosos de los secuestradores de NO o peroxinitrito, como el ácido úrico, mientras que la eliminación de los inhibidores de la iNOS conduce a la aparición de los síntomas de la EAE (Hooper y col., 1997; Hooper y col., 1998).

4. Sal de calcio, magnesio y potasio de fosfato de etanolamina

La etanolamina forma parte de un fosfolípido de membrana, la fosfatidiletanolamina (PE), cuya función específica es la de mantener la fluidez de la membrana. De este modo, se mantiene la eficiencia de los mecanismos de transducción de neuromoduladores y neurotransmisores (Newman y col., 1986). Además, es precursora de otras biomoléculas como la colina y la anandamida (Natarajan y col., 1986; Hansen y col., 2000). La etanolamina está presente en las vainas de mielina del sistema



nervioso de diferentes organismos en forma de plasmalógenos (Sheltawy y Dawson, 1966).

En los años sesenta del siglo pasado, el doctor Nieper comenzó a utilizar, en Alemania occidental, una sal de calcio, potasio y magnesio de fosfoetanolamina (PEA) en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y, de un modo particular, en el tratamiento de la EM. Las publicaciones respecto a la eficacia de esta sal son anecdóticas (Nieper y Moller, 1962; Nieper, 1967; Nieper, 1968; Nieper, 1994). Una búsqueda bibliográfica extensa no muestra ningún estudio clínico y experimental controlado. Sin embargo, recientemente se han publicado algunos trabajos sobre aspectos básicos de la colamina, etanolamina y sus derivados *in vitro* que sugieren que una sal de PEA podría ser eficaz en la EM y en la EAE. Así, se ha descubierto que los plasmalógenos de etanolamina son poderosos antioxidantes que previenen la oxidación de las membranas celulares, impidiendo la oxidación del colesterol y la peroxidación de lípidos (Maeba y col., 2002; Maeba y Ueta, 2003a; Maeba y Ueta, 2003b; Bisaglia y col., 2004; Maeba y Ueta, 2004). Recientemente, se ha demostrado que la molécula de dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE) bloquea la activación de células T específicas de antígeno (Legler y col., 2001). Algunos autores sugieren que hay una sinergia entre las células T y B en la inducción de la EAE (Willenborg y col., 1983; Myers y col., 1992).

Existen derivados de la PEA que contribuyen a estabilizar las membranas neuronales. Estos derivados son los fosfolípidos de N-acil-etanolamina (NAPEs) (Newman y col., 1986; Akoka y col., 1988; Domingo y col., 1994). Los NAPEs se sintetizan a partir de la PEA mediante una N-acil-transferasa y se transforman en N-acil-etanolamina (NAEs) por la acción de una fosfolipasa D hidrolizante de NAPE (Hansen y col., 2002). Durante el daño cerebral, tal como la inflamación, la síntesis de NAEs se acelera, aumentando así la estabilidad de las membranas neuronales (Moesgaard y col., 2000). Uno de estos NAEs es la anandamida, un agonista parcial del receptor CB1 (Sugiura y col., 1999; 2000), cuya activación tiene distintos efectos neuroprotectores (Nagayama y col., 1999; Sinor y col., 2000; Braida y col.), entre ellos, la inhibición de la muerte de las células dañadas, la estimulación de procesos apoptóticos en las células colindantes para evitar la extensión de la necrosis y la inhibición de la liberación de mediadores que promueven la necrosis y la inflamación (Hansen y col., 2002). Se ha demostrado que el arvanil, un derivado de la anandamida, inhibe la activación de los



linfocitos T, mejorando los síntomas de la EAE (Malfitano y col., 2005). Asimismo, se ha descrito que los derivados de la etanolamina previenen la muerte celular apoptótica inducida por el estrés oxidativo (Brand y col., 2000).

Recientemente, se ha publicado que derivados de etanolamina facilitan los procesos cognitivos y aumentan selectivamente la transducción de señales en neuronas (Florio y col., 1999), aumentan la síntesis de acetilcolina (Bostwick y col., 1992) y tienen propiedades neuroprotectoras (Hansen y col., 2002).. Se ha demostrado, además, una disminución del porcentaje de fosfatidiletanolamina en membranas procedentes del SNC en ratas con EAE (Jagannatha y col., 1981; Salvatti y col., 1990).

Estos hallazgos, junto con el hecho de que el estrés oxidativo contribuye a la lesión del SNC tanto en la EM como en la EAE (Pierson y col., 1995) sugieren una utilidad terapéutica de la etanolamina en dichas patologías.

II. SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO

A. SOMATOSTATINA

1. Descubrimiento de la somatostatina

A finales de los años sesenta, Krulich y col. (1968) descubrieron en extractos de hipotálamo ovino una sustancia capaz de inhibir la secreción de la hormona del crecimiento (GH) en cultivos de células adenohipofisarias. Se postuló que este factor, que recibió el nombre de “factor inhibidor de la GH”, podría tener una función fisiológica opuesta al “factor liberador de la GH”, caracterizado con anterioridad por Dhariwal y col. (1965). Sin embargo, se desconocía la naturaleza de dicho péptido hipotalámico hasta que Brazeau y col. (1973), en el laboratorio de Roger Guillemin, aislaron un tetradecapéptido de hipotálamo ovino que inhibía la secreción de GH tanto *in vivo* como *in vitro*. En 1977, Roger Guillemin recibió el premio Nobel de Medicina y Fisiología por este descubrimiento. El tetradecapéptido aislado se denominó factor inhibidor de la secreción de la somatotropina o somatostatina (SRIF), siendo este último término el más aceptado en la actualidad. La inhibición de la secreción de GH, sin embargo, sólo era una de las numerosas acciones mediadas o reguladas por la SRIF, como se demostró posteriormente. Se comprobó, además, que la SRIF no sólo se localiza en el hipotálamo, sino que está ampliamente distribuida por todo el SNC y en la mayoría de los órganos periféricos (Hokfelt y col., 1975; Patel y Reichlin, 1978; Reichlin, 1983). Este péptido está presente tanto en el reino animal, en vertebrados e invertebrados, como en el reino vegetal (Reichlin, 1983; Patel, 1992).

2. Estructura y biosíntesis de la somatostatina

Existen dos formas biológicamente activas de SRIF, la SRIF-14 y la SRIF-28. La SRIF-28 es una extensión amino-terminal de la SRIF-14 que fue aislada y caracterizada por Pradayrol y col. en 1980. La SRIF-14 es un péptido de estructura cíclica que posee 14 aminoácidos estabilizados por un puente disulfuro entre las cisteínas 3 y 14 de la molécula (Figura 2). Mediante modificaciones químicas de la estructura del anillo, se ha podido localizar su centro activo (Lucey y Yamada, 1989), que se sitúa entre los aminoácidos 7 y 10 (Figura 2).



La SRIF-14 tiene una vida media muy corta y es muy sensible a la degradación enzimática. Por ello, se han diseñado análogos sintéticos más cortos y menos sensibles al ataque enzimático, tales como el SMS 201-995 (octreótido) o el BIM23014 (lanreótido), muy utilizados en la clínica para el tratamiento de la acromegalia y de tumores gastrointestinales (Figura 2). Por otro lado, se han diseñado análogos susceptibles de ser yodados, mediante sustitución de una Phe por una Tyr, de modo que puedan ser utilizados como trazadores.

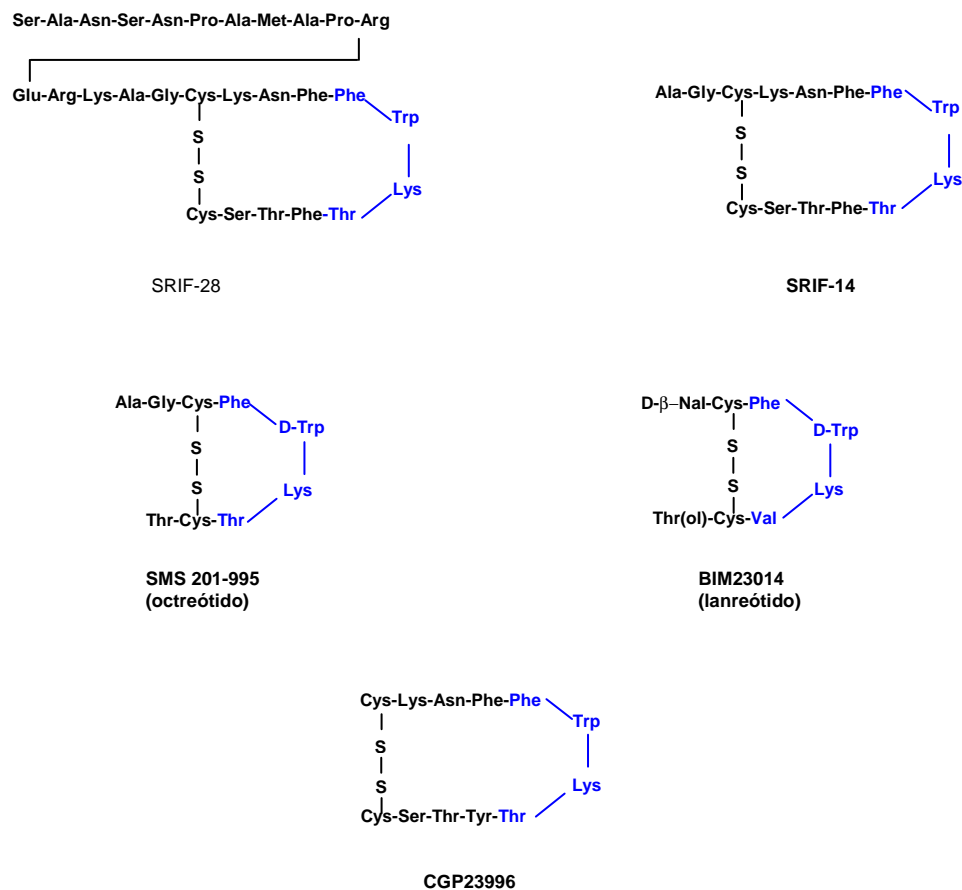


Figura 2. Estructura química de la SRIF y de distintos análogos de SRIF.

Mientras que en mamíferos hay un único gen que codifica tanto para la SRIF-14 como para la SRIF-28, se ha demostrado que en peces existen dos genes diferentes para cada una de las dos formas (Patel, 1992). El gen de SRIF presente en mamíferos contiene dos exones de 238 y 263 pares de bases, respectivamente, separados por un intrón de 621 pares de bases. En el extremo 5' de dicho gen, entre los dos promotores (cajas TATA y

CAAT), se encuentra un elemento de respuesta al adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (CRE) (Figura 3).

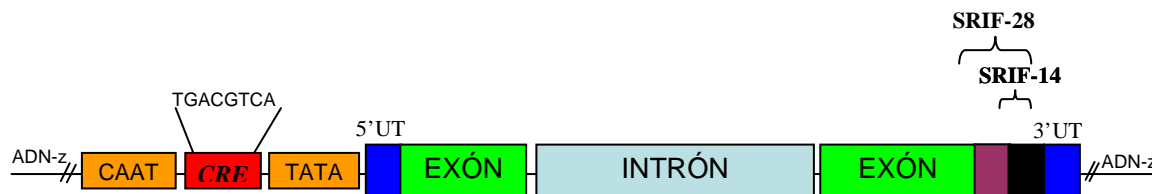


Figura 3. Estructura del gen de la somatostatina de rata.

La SRIF deriva de una molécula precursora, la pre-proSRIF, que se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso y se libera al lumen del retículo. Allí, la pre-prohormona se hidroliza rápidamente, entre la glicina-24 y la glicina-25, por acción de proteasas específicas, originando una molécula de 92 aminoácidos y 10 kDa denominada pro-SRIF (Figura 4). La pro-SRIF es transportada al aparato de Golgi y después se introduce en vesículas de secreción. En el interior de estas vesículas, se produce la ruptura de la prohormona por medio de proproteína convertasas (PC). Se han identificado, hasta la fecha, ocho isoformas de esta enzima, denominadas PC1-6, furina y PACE-4, siendo la furina la principal convertasa implicada en este proceso (Patel y Galanopoulou, 1995; Schindler y col., 1997a).

La ruptura de la pro-SRIF se lleva a cabo por el extremo carboxilo-terminal en residuos dibásicos (Arg-Lys), dando lugar a la SRIF-14, y en un residuo monobásico (Arg), generando la SRIF-28. Dentro de las vesículas se origina también la SRIF₁₋₁₀ o antrina, por hidrólisis en el dominio monobásico (Lys) del extremo amino-terminal. Las convertasas antes mencionadas requieren la presencia de los residuos mono- y dibásicos para poder hidrolizar la proteína; sin embargo, existen otros requerimientos estructurales para que la prohormona pueda hidrolizarse de forma correcta (Brakch y col., 1993). En general, el procesamiento de la pro-SRIF parece ser distinto dependiendo del tipo celular en el que se exprese (Brakch y col., 1995). La acción de diferentes PC da lugar a otros productos que carecen de actividad biológica conocida: la SRIF-28_[1-12], la pro-SRIF_[1-76] (8kDa), y la pro-SRIF_[1-63] (7 kDa) (Figura 4).

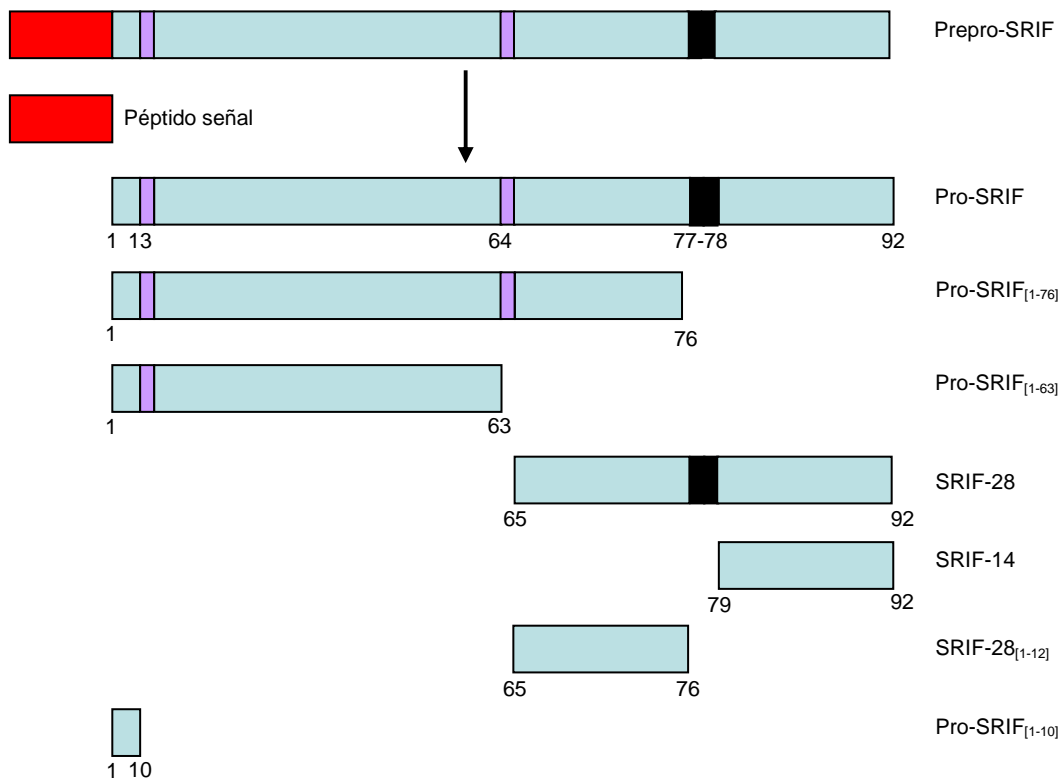


Figura 4. Esquema de los productos generados a partir del procesamiento de la prepro-somatostatina de mamíferos.

La expresión y secreción de la SRIF están reguladas por diferentes factores, entre ellos, nutrientes, neurotransmisores y neuropéptidos (Tabla 2). Así, agonistas de los receptores de N-metil-D-aspartato (en corteza), la GH (en hipotálamo), glucocorticoides (en hipotálamo y corteza), la IL-1 y el TNF (en cultivos de diencefalo) aumentan tanto la secreción de la SRIF como la expresión del gen de dicho péptido (Rubinow y col., 1995).

El AMPc regula la expresión del gen de la SRIF a través del CRE, al que se une la proteína de unión a CRE (CREB). La eficacia transcripcional se regula por fosforilación de dicha proteína mediante la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Goodman y col., 1990). La fosforilación de CREB por parte de esta quinasa está regulada por la unión del coactivador denominado proteína fijadora de CREB (CBP). *In vivo*, la proteína CREB puede estar o no unida constitutivamente al CRE dependiendo del tipo de célula (Chamolstad y col., 2004). Para que la proteína CREB se una a CRE, el complejo de coactivadores CBP/p300 ha de estar desmetilado. Cuando el complejo está metilado, se impide la fosforilación de CREB y, por ende, la transcripción (Xu y col., 2001). Además

del AMPc, iones y activadores de la proteína quinasa C (PKC) también regulan la expresión de la SRIF.

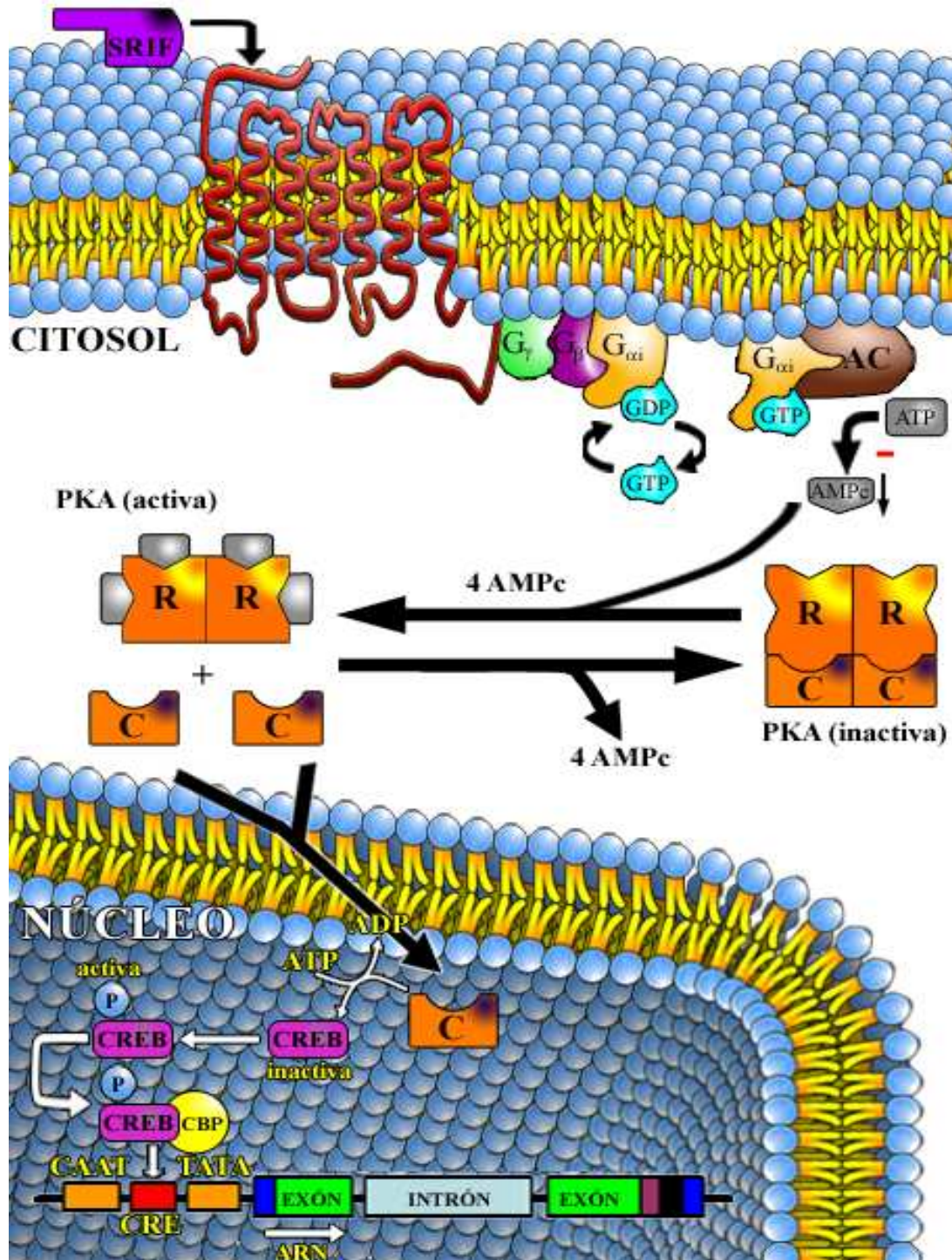


Figura 5. Regulación de la transcripción del gen de la somatostatina por la vía del adenosín monofosfato cíclico.

**Tabla 2.** Regulación de la expresión génica de la somatostatina mediada por distintas moléculas.

Efectos sobre los niveles de ARNm de la SRIF		
Estimulación	Reducción	Estimulación o Reducción
AMPc Ca ²⁺ GMP _C NO Testosterona Estrógenos GH IGF-I e IGF-II IL-1, IL-6 e IL-10 TGF-β	Insulina Leptina	Glucocorticoides

AMPc: Adenosín-monofosfato cíclico; GMPc: Guanosín-monofosfato cíclico; NO: Óxido nítrico; GH: Hormona del crecimiento; IGF: Factor de crecimiento similar a insulina; IL: interleuquina; TGF-β: Factor de crecimiento transformante.

3. Localización de la somatostatina

Las células productoras de SRIF poseen una morfología típica. Estas células se caracterizan por la presencia de múltiples prolongaciones, como es el caso de las neuronas productoras de SRIF (Bordi y col., 1996) o de las células D del páncreas, que se encuentran en los islotes de Langerhans (Baetens y col., 1979). Las células somatostatinérgicas están distribuidas ampliamente por todo el organismo (Tabla 3); se localizan principalmente en el SNC y sistema nervioso periférico, páncreas endocrino e intestino y, en menor medida, en tiroides, glándulas adrenales, glándulas submandibulares, riñón, próstata, placenta y testículo (Patel, 1992). En la glándula tiroidea, la SRIF coexiste con la calcitonina en las células C (Baetens y col., 1979).

a. Distribución en el SNC

A pesar de haber sido inicialmente descubierta en el hipotálamo (Pelletier y col., 1975), la SRIF se encuentra en mayor concentración en áreas extrahipotalámicas. Así, la amígdala, el septum, el tubérculo olfatorio y el hipocampo son áreas muy ricas en SRIF. El estriado, la corteza y la sustancia negra son áreas con niveles moderados del péptido,



mientras que el cerebelo y el bulbo olfatorio poseen una concentración muy baja de SRIF (Schindler y col., 1997).

Tabla 3. Distribución de la somatostatina en el sistema nervioso central y tejidos periféricos

Principales localizaciones de la SRIF	Tipo celular	Localización
Sistema nervioso	Neuronas	Hipotálamo Corteza Hipocampo Sistema límbico Ganglios basales Ganglio autonómico Médula espinal
Páncreas	Células D	Islotes de Langerhans
Intestino	Células D Neuronas	Plexos submucoso y mientérico
Otras localizaciones		
Glándulas adrenales	-	Células medulares dispersas
tiroides	Células C	Células parafoliculares dispersas (coexiste con la calcitonina)
Sistema urinario	-	Células de los glomérulos renales y de los tubos colectores

Se ha descrito la presencia de SRIF y de su ARNm en toda la escala de los vertebrados, desde anfibios hasta mamíferos. La secuencia del gen de la SRIF se mantiene altamente conservada en todas esas especies, a pesar de las diferencias existentes entre ellas (Vaudry y col., 1992; Yáñez y col., 1992). Mediante hibridación *in situ*, se ha demostrado que tanto en humanos como en ratas, el ARNm de la preproSRIF se encuentra ampliamente distribuido por el SNC (Hiyama y Emson, 1990; Mengod y col., 1992). Así, se encuentran señales intensas en toda la corteza cerebral de la rata, especialmente en las capas V y VI y, de una forma más uniforme, en la corteza cerebral humana. En el hipocampo, todas las regiones CA contienen ARNm de SRIF, mientras que en el giro dentado de la rata, el ARNm sólo se distribuye por la capa polimórfica. Las zonas con mayor cantidad de ARNm de SRIF son el núcleo dorsal del septum lateral y las



neuronas de la amígdala. En el globo pálido de rata y de humano, no existen células con SRIF mientras que tanto el estriado como el núcleo accumbens poseen cantidades moderadas de la misma (Augoog y col., 1991). En el hipotálamo, la mayor densidad de células productoras de SRIF se encuentra en el núcleo paraventricular. En dicho núcleo, se coexpresan los ARNm de la SRIF y de los receptores de GH, sugiriendo una regulación de la liberación de GH por las células somatostatinérgicas (Burton y col., 1992). En la sustancia negra del cerebro humano, no se ha podido demostrar la presencia del ARNm de la SRIF. En el cerebelo de rata, se ha detectado dicho ARNm a nivel de la capa granular, mientras que en humanos parece estar totalmente ausente (Cooper y col., 1981; Johansson y col., 1984). En la médula de humanos y de rata, existe un gran número de neuronas positivas para la SRIF en la espina dorsal y núcleo del tracto solitario así como en los núcleos trigeminales espinales.

4. Acciones fisiológicas de la somatostatina

La síntesis y el aislamiento de la SRIF-14 dio lugar al descubrimiento de una gran variedad de acciones fisiológicas mediadas por dicho péptido (Patel, 1999). La amplia distribución de la SRIF en el SNC sugiere que la SRIF tiene un papel neuromodulador o neurotransmisor. Tiene especial interés el hecho de que la SRIF es la contrapartida endógena del factor liberador de GH, puesto que inhibe la secreción de dicha hormona. Además, los niveles del ARNm de la SRIF están regulados por la cantidad de GH circulante. Así, ratones transgénicos con elevada concentración de GH en sangre poseen también niveles elevados de SRIF, mientras que si la situación es la inversa (ratones con baja concentración de GH en el torrente sanguíneo), la cantidad de SRIF es más moderada (Hurley y Phelps, 1992).

En el cerebro, la SRIF desempeña funciones cognitivas, locomotoras, sensoriales y ejerce efectos tanto estimuladores como inhibitorios sobre las funciones autonómicas. Por otro lado, la SRIF es capaz de inhibir la secreción de un gran número de hormonas y neurotransmisores como la dopamina, la noradrenalina, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la hormona liberadora de corticotropina (CRH) o la hormona estimuladora del tiroides (TSH), además de la GH mencionada anteriormente. La SRIF no posee efectos directos sobre otras hormonas como la prolactina o la corticotropina



(ACTH), aunque en patologías como la enfermedad de Addison o la acromegalia, la SRIF es capaz de disminuir los niveles elevados de ACTH o de prolactina, respectivamente.

En los tejidos periféricos, la SRIF también posee multitud de funciones. A nivel gastrointestinal, la SRIF inhibe la secreción de prácticamente todas las hormonas intestinales estudiadas hasta hoy, así como la secreción intestinal exocrina (ácido gástrico, pepsina, bilis y fluido colónico). Por otro lado, la SRIF reduce la motilidad del sistema digestivo, suprime el vaciado gástrico, la contracción de la vesícula biliar y la segmentación del intestino delgado. En el tiroides, la SRIF inhibe la secreción de triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (T4), por inhibición de la secreción de TSH, así como de la calcitonina. En la glándula adrenal, la SRIF reduce la secreción de aldosterona estimulada por angiotensina II y la secreción de catecolaminas medulares estimulada por acetilcolina. A nivel renal, la SRIF inhibe la liberación de renina provocada por una hipovolemia y la absorción de agua mediada por la hormona antidiurética. Otros efectos de la SRIF incluyen la vasoconstricción (especialmente en circulación esplácnica) y la inhibición de la proliferación de linfocitos y células precursoras de la mucosa intestinal, cartílago y hueso (Weiss y col., 1981; Reichlin, 1983; Patel, 1992; Aguilar y col., 1996; Takeba y col., 1997).

En la última década, se ha demostrado que la SRIF también posee propiedades inmunorreguladoras. En monocitos circulantes o macrófagos periféricos, la SRIF inhibe la síntesis del ARNm del TNF- α , estimulada por el propio TNF- α , y la expresión de sus receptores (Chao y col., 1995; Peluso y col., 1996). La SRIF también inhibe la proliferación de la microglia en condiciones tanto basales como estimuladas. En microglia, la SRIF inhibe la fosforilación de proteínas estimuladas por el factor estimulador de colonias macrófago-granulocito (GM-CSF) (Giulian y Baker, 1986). En astrocitos de corteza cerebral de rata, la SRIF inhibe la secreción de IL-6 a través de la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) (Grimaldi y col., 1997).

B. RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

La SRIF ejerce sus acciones fisiológicas mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la membrana plasmática de las células diana (Schonbrunn y Tashjian, 1978). Los receptores de SRIF se acoplan a múltiples sistemas efectores a través de proteínas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G) (Reisine y col.,



1995(b)). Estos efectores incluyen enzimas, como la AC, fosfotirosina fosfatasas (PTPs), proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y fosfolipasas, así como canales iónicos, tanto de calcio como de potasio.

1. Estructura de los receptores de somatostatina

Hasta la fecha se han clonado cinco subtipos de receptores de SRIF, denominados sst1-sst5 (Raynor y col., 1993a; Schindler y col., 1998). En un principio, se clonaron los subtipos sst1 y sst2 de ratón, de humano y de rata (Yamada y col., 1992a; Kluxen y col., 1992) y, posteriormente, el sst3 de ratón y de humano (Yasuda y col., 1992; Yamada y col., 1992b) así como el sst4 de rata y de humano (O'Carroll y col., 1992). Por último, se clonó el subtipo sst5 de rata y de humano (Bruno y col., 1992; Rohrer y col., 1993). En ratón y en rata, existen dos isoformas del subtipo 2, sst2A y sst2B, que se originan por procesamiento alternativo a partir del mismo ARNm (Vanetti y col., 1992; Schindler y col., 1998).

Los cinco subtipos de receptores de SRIF pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los miembros de esta familia se caracterizan por poseer siete dominios transmembrana α -helicoidales, tres bucles extracelulares, tres bucles intracelulares, un extremo amino-terminal extracelular y un dominio carboxilo-terminal intracelular. Los distintos sst poseen un alto grado de homología, tanto en secuencia como en tamaño y estructura, con una longitud que oscila entre los 356 y los 391 aminoácidos. La mayor homología se encuentra en los dominios transmembrana, mientras que los extremos amino- y carboxilo-terminal son los que presentan mayores diferencias (Reisine y Bell, 1995a; Patel y Srikant, 1997; Patel y col., 1999) (Figura 6). La secuencia más conservada entre los cinco sst es una secuencia situada en el séptimo dominio transmembrana, YANSCANPI/VLY, que constituye la señal de identidad de dichos receptores. De modo similar a otros GPCRs, los sst tienen entre una y cuatro secuencias consenso en el extremo amino-terminal que sirven como dianas de glicosilación. El subtipo sst5 presenta un lugar adicional de glicosilación en el segundo bucle extracelular mientras que sst2 puede glicosilarse en la parte externa del sexto dominio transmembrana. En el primer y segundo bucle extracelular existen dos residuos de cisteína muy conservados que podrían dar lugar a la formación de puentes disulfuro similares a los que existen en los receptores β 2-adrenérgicos (Dohlmann y col., 1990).

Todos los sst presentan entre tres y ocho sitios de reconocimiento para la PKA y la PKC, tanto en el extremo carboxilo-terminal como en el segundo y tercer bucle intracelular, lo que sugiere que el receptor podría ser regulado mediante fosforilación. Todos los receptores de SRIF, excepto el sst3, poseen una cisteína en el séptimo dominio transmembrana que es susceptible de ser palmitoilado. La unión covalente del ácido palmítico en esta posición puede crear un cuarto bucle citoplásmico. La modificación de los sst por ácidos grasos, como el ácido palmítico, podría tener un significado funcional muy importante. Se ha demostrado que la palmitoilación del receptor de endotelina A humano, por ejemplo, afecta a la activación de los efectores celulares tras la unión del agonista a su receptor (Hostmeyer y col., 1996). Curiosamente, el subtipo sst3 posee un extremo carboxilo-terminal mucho más largo que el resto de los receptores de SRIF. Este extremo más largo está implicado en los procesos de internación y desensibilización del sst3 (Roth y col., 1997). Los receptores de SRIF también poseen residuos de tirosina cuya fosforilación provoca la internación del receptor (Meyerhof, 1998).

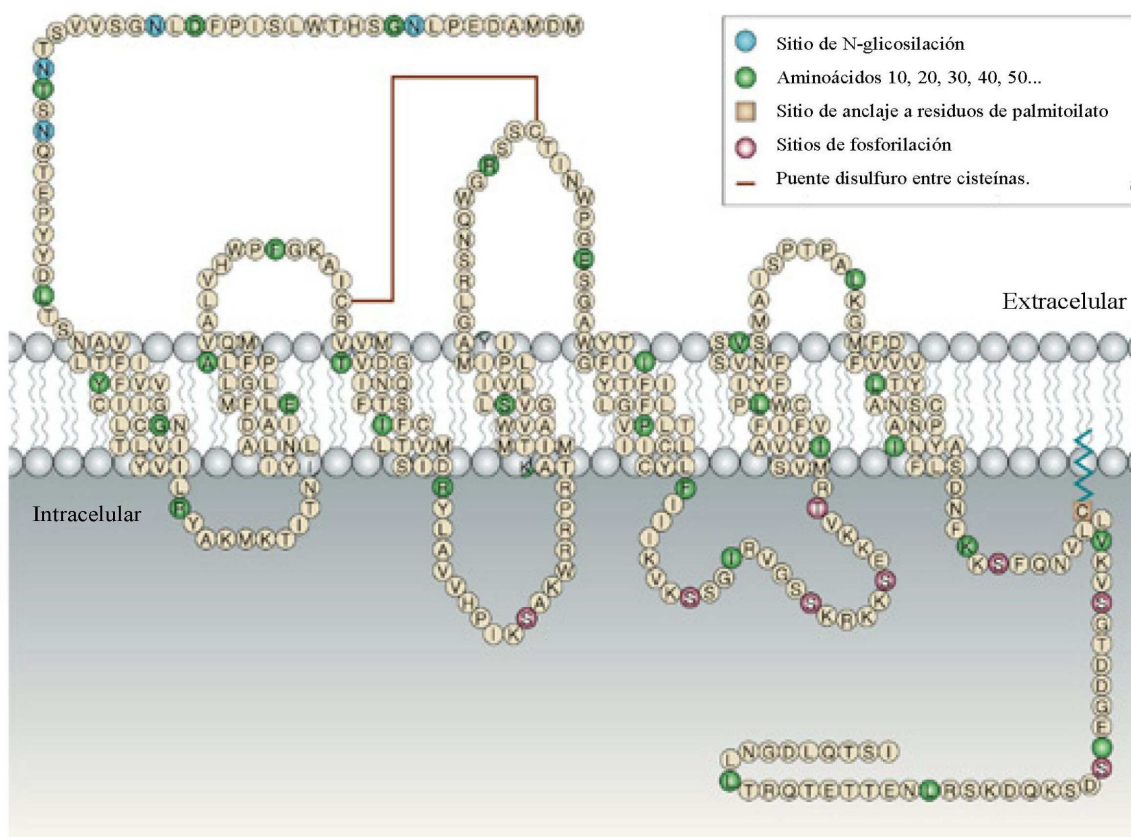


Figura 6. Representación esquemática del receptor de somatostatina tipo 2 de rata. (Tomada de Weckbecker G. et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Dec; 2(12):999-1017)



2. Estructura de los genes de los receptores de somatostatina

Los genes que codifican los cinco subtipos de receptores de SRIF están localizados en distintas cromosomas. En humanos, los genes de los subtipos sst1, sst2, sst3, sst4 y sst5 se localizan en los cromosomas 14, 17, 22, 20 y 16, respectivamente (Yasuda y col., 1993; Takeda y col., 1995; Baumeister y Meyerhof, 2000). Estos genes carecen de intrones entre las regiones codificadoras, con excepción del gen del sst2 de rata y ratón. Dicho gen presenta dos intrones, lo que va a originar, mediante procesamiento alternativo, dos variantes del receptor, sst2A y sst2B (Vanetti y col., 1993). Sin embargo, se ha observado que la región terminal 5' no traducida (5' UTR) de los genes del sst2 y del sst5 de ratón, así como del sst3 de rata, contienen intrones (Baumeister y Meyerhof, 2000). Los principales estudios se han centrado en caracterizar las zonas promotoras de estos cinco genes. Así, se ha demostrado que los genes de los subtipos sst1, sst3, sst4 y sst5 poseen un único promotor en la mayoría de las especies. Sin embargo, el gen del sst2 contiene tres zonas promotoras que, en el caso del ratón, están separadas por dos intrones (Figura 7) (Kraus y col., 2000).

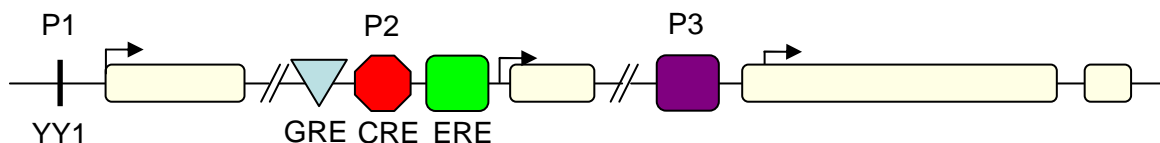


Figura 7. Estructura del gen del receptor de somatostatina sst2 de ratón. El gen está formado por cuatro exones (cajas beige) y dos intrones (líneas oblicuas); contiene tres promotores (P1-P3) cuyos sitios de iniciación de la transcripción están indicados con flechas. P1 presenta un sitio de unión para el factor de transcripción YinYan 1 (YY1) y P2 presenta un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), un elemento de respuesta a AMPc (CRE) y un elemento de respuesta a estrógenos (ERE).

La activación del primer promotor sólo se ha encontrado en células tumorales hipofisarias AtT-20. El segundo promotor, P2, se activa en aquellos tejidos en los que la SRIF y sus receptores ejercen funciones fisiológicas vitales tales como en el cerebro, hipófisis, glándulas adrenales, páncreas, estómago y testículos. El tercer promotor se encuentra activado en el pulmón, riñón, bazo, útero y ovarios. La caracterización de dichos promotores revela que estas zonas no contienen las clásicas cajas TATA y CAAT, al igual que en la mayoría de los genes de receptores con siete dominios transmembrana. En su lugar, se han encontrado elementos proximales en la zona próxima al sitio de



iniciación de la transcripción. En la rata, estos elementos están constituidos por sitios de unión con alto contenido en guanina y citosina, mientras que en humanos son zonas ricas en timina y citosina. En las zonas promotoras, también existen varias secuencias consenso de distintos elementos de respuesta que regulan la transcripción de los cinco subtipos de receptores en las distintas especies animales y en distintos tejidos. El elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) se encuentra en el promotor de los genes de los subtipos sst1, sst3 y sst5. A su vez, el gen del sst1 y del sst5 posee un elemento de respuesta a progesterona y glucocorticoides. El gen del sst2 y del sst3 contiene un elemento CRE; el gen del sst2 contiene, además, un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Kraus y col., 2000). Asimismo, se ha descrito que los cinco subtipos de receptores presentan un elemento de respuesta a estrógenos (ERE), aunque solamente ha sido caracterizado en el gen del sst2 (Kimura y col., 2001).

3. Características farmacológicas de los receptores de somatostatina

A la vista de la multitud de efectos biológicos que posee la SRIF, existe un gran interés tanto farmacológico como farmacéutico en el desarrollo de compuestos con acciones específicas para su uso tanto en investigación como en la clínica. Así, existen muchos análogos sintéticos de la SRIF, tanto cíclicos como lineales. Los péptidos endógenos, SRIF-14 y SRIF-28, tienen acciones muy localizadas, ya que son producidos localmente en los lugares donde van a actuar y se degradan rápidamente mediante endopeptidasas. Debido a su corta vida media, se han sintetizado análogos de SRIF más estables frente a la degradación proteolítica que puedan utilizarse en terapias farmacológicas. El análogo más empleado en clínica es el SMS-201-995 (Reisine y col., 1995b); Lamberts y col., 1991; Lamberts y col., 1996). Puesto que tienen distintas afinidades por los diferentes sst, el SMS 201-995 así como el BIM23014 han sido utilizados para diferenciar entre dos familias de sst: una familia que incluye los receptores de baja afinidad para estos análogos (sst1 y sst4) y otra familia que incluye los receptores de alta afinidad para los mismos (sst2, sst3 y sst5) (Patel y col., 1999).

Existen numerosos estudios que demuestran que el subtipo sst1 une con similar afinidad la SRIF-14 y la SRIF-28. Sin embargo, muy pocos análogos sintéticos pueden unirse con alta afinidad a este receptor y ninguno es específico del sst1. El sst2 presenta también una alta afinidad por los dos péptidos endógenos, así como por el hexapéptido MK678, que es específico de dicho receptor. La SRIF-14 y la SRIF-28 se unen también



con alta afinidad al receptor sst3, aunque éste presenta muy baja afinidad por el MK678. Sin embargo, el BIM23056 parece ser específico del sst3. El subtipo sst4 presenta una homología del 61% con sst1, por lo que su afinidad por los análogos sintéticos así como por las formas endógenas de SRIF es similar a éste. El receptor sst5 posee unas cualidades únicas dentro de la familia de los sst ya que posee hasta 6 veces más afinidad por la SRIF-14 que por la SRIF-28 y se une a una gran cantidad de análogos sintéticos (Bell y col., 1999).

4. Regulación de los receptores de somatostatina

a. Regulación dependiente de agonista

La administración aguda de SRIF produce una pléyade de efectos inhibitorios mientras que cuando la administración es prolongada, estas respuestas disminuyen, llegando incluso a desaparecer (Lamberts y col., 1991; Reisine y Bell., 1995a; Patel y col., 1999). Está bien establecido que la fosforilación desempeña un papel muy importante en la regulación de los sst. Se ha demostrado que una vez que los receptores se han activado, debido a la unión de su agonista, éstos se desensibilizan mediante fosforilación de residuos de serina y treonina presentes en el dominio carboxilo-terminal intracelular del receptor, provocando un desacoplamiento entre el sst y la proteína G. Dicha fosforilación está catalizada por miembros de la familia de quinasas de GPCRs (GRKs) (Gainetdinov y col., 2004), de la que actualmente se conocen siete miembros denominados GRK1-GRK7. Mediante estudios de hibridación *in situ*, se ha demostrado que las isoformas GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 son las que se expresan mayoritariamente en cerebro de rata (Erdtmann-Vourliotis y col., 2001). Por lo tanto, la fosforilación del receptor y el posterior reclutamiento de proteínas citosólicas denominadas arrestinas (Oakley y col., 2001) producen el desacoplamiento entre el receptor y la proteínas G, y la consiguiente internación y posterior degradación del receptor. Todos los sst, excepto el sst4, se desensibilizan mediante el mecanismo descrito anteriormente. El sst4 posee una alanina en lugar de una treonina en la posición 331 en el extremo carboxilo-terminal. Se ha observado que el subtipo sst4 de rata transfectado en células de riñón humano, después de su activación por el agonista, posee una cierta resistencia a la desensibilización e internación. En estas mismas células transfectadas con



los subtipos sst1, sst2 y sst3 de rata, se ha descrito que los tres receptores se internan rápidamente después de la exposición a SRIF-14 (Kreienkamp y col., 1998) Sin embargo, se ha demostrado que los sst humanos transfectados en células de ovario de hámster chino (CHO-K1) sufren una rápida internación tras la exposición prolongada a la SRIF, excepto el subtipo sst1 (Hukovic y col., 1999). La máxima internación la sufre el subtipo sst3 (78%) seguido del sst5 (66%), el sst4 (29%) y el sst2 (20%). Existe una cierta discrepancia en los porcentajes de internación de los receptores entre distintos grupos de investigación. Esto se debe, al menos en parte, a las diferencias estructurales entre los subtipos de sst de rata y de humano, así como a la línea celular utilizada para transfectar los receptores.

b. Regulación de la expresión de los receptores de somatostatina

La regulación de los genes que codifican para los distintos sst depende del tejido en que se expresen. Una gran variedad de hormonas y algunas situaciones patológicas también influyen en la expresión de dichos genes. Así, en la diabetes mellitus tipo I, se observa una disminución en los niveles de ARNm de sst1, sst2 y sst3 en la hipófisis y de sst5 en el hipotálamo (Bruno y col., 1994), mientras que se ha demostrado una disminución del ARNm de sst2 en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer (Aguado-Llera y col., 2005) y en enfermos de epilepsia (Csaba y col., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que el ARNm de los sst aumenta como respuesta al AMPc (ya que los genes poseen regiones CRE (Patel, 1992)), a la gastrina, al factor de crecimiento epidérmico (EGF) o a la propia SRIF (Patel y col., 1993; Moller y col., 2003). Los estrógenos aumentan los niveles de ARNm de sst1, sst2 y sst3, puesto que los genes correspondientes poseen elementos de respuesta a estrógenos (Kimura, 1998). La testosterona ejerce efectos similares (Vidal y col., 1994), mientras que la progesterona incrementa los niveles de ARNm de sst1 y sst2 pero provoca un descenso en los niveles de ARNm de sst3.

Hauser y col. (1994) identificaron en el receptor sst1 sitios de unión para el factor de transcripción específico de hipófisis denominado Pit-1. El factor Pit-1 parece actuar como un regulador clave en la secreción de GH, actuando a nivel transcripcional, regulando la actividad tanto del gen de la GH como de los receptores que activan las vías de señalización en células somatotróficas (Baumeister y col., 2000). Se ha demostrado



que la eliminación funcional del ARNm de Pit-1 mediante el empleo de oligonucleótidos antisentido bloquea la expresión de sst1.

El gen del receptor sst2 humano posee la caja GC característica de los genes de receptores acoplados a proteínas G y carece de las secuencias TATAA y CAAT (Greenwood y col., 1995). Xu y col. (1998) comprobaron que la expresión de este receptor es regulado por el 17 β -estradiol de forma dependiente del tiempo y de la dosis en células tumorales de cáncer de mama. Dicha regulación parece estar mediada por un segmento distal de aproximadamente 1,5 kb localizado a 3,8 kb del sitio de inicio de transcripción.

Por otro lado, se ha demostrado que el gen del sst3 posee un GRE, por lo que la expresión de dicho receptor está regulada por glucocorticoides. Paralelamente a los sst1 y sst2, el aumento de los niveles de progesterona reduce los niveles del mensajero de sst3 (Patel, 1999; Vidal y col., 1994).

El análisis del gen del sst4 muestra multitud de sitios de unión SP-1, AP-2, CGF y PuF, así como un motivo de octámero (regiones de 8 nucleótidos a la que se unen factores de transcripción). Se han identificado regiones reguladoras de tipo AP-3, E-2A y GCF (Greenwood y col., 1995). Se cree que la respuesta del gen de sst4 a AMPc está probablemente regulada por la presencia de los elementos AP-1 y AP-2 en lugar de un elemento CRE propiamente dicho. Montminy et al. (1986) demostraron que los elementos CRE responden a un aumento de la concentración de AMPc, que en última instancia, provoca un aumento de la activación de la subunidad catalítica de PKA. Sin embargo, en lo que respecta al gen del sst4, la microinyección de subunidades catalíticas de PKA activas no provoca el aumento esperado en la concentración del ARNm del receptor, por lo que el AMPc no es capaz de activar la expresión de sst4 mediante CRE (Moller y col., 2003).

De modo similar, se ha demostrado que el gen del sst5 de ratón responde a los elementos reguladores AP-1 y AP-2. Además, posee elementos de respuesta a glucocorticoides y a ésteres de forbol. En células tirotróficas TtT-97, se ha conseguido inducir la expresión del ARNm del sst5 mediante tiroxina (Baumeister y col., 1998).

5. Localización de los receptores de somatostatina

Estudios autorradiográficos e inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de receptores de SRIF en el SNC, glándulas adrenales, páncreas exocrino y endocrino y



tracto gastrointestinal, así como en un gran número de líneas celulares (Meyerhof, 1998). A continuación, se describe la localización de cada subtipo de sst en dichas áreas.

a. Sistema nervioso central

Mediante el empleo de análogos de SRIF como el MK678 o el SMS 201-995, y utilizando distintas técnicas, se ha podido analizar la distribución de los distintos subtipos de sst en diferentes regiones cerebrales (Kluxen y col., 1992; Kong y col., 1994; Mori y col., 1997).

En el cerebro de la rata, los ARNm de los subtipos sst1-4 se han localizado, mediante hibridación *in situ*, en corteza, estriado, hipotálamo, amígdala e hipocampo (Bruno y col., 1993; Meyerhof, 1998). El sst1 es el más abundante a lo largo del eje neural, el sst2 es el más abundante en corteza, mientras que el receptor sst5 es especialmente abundante en hipotálamo e hipófisis, con niveles muy bajos en otras áreas cerebrales. Los mayores niveles de ARNm de sst3 se detectan en el cerebelo, especialmente en la capa granular (Kong y col., 1994) y su distribución es homogénea en el resto del SNC.

Mediante el empleo de sondas de ARNc específicas, se ha comprobado que el transcrito de sst1 se encuentra ampliamente distribuido por todo el SNC de la rata, encontrándose los niveles más altos en el hipocampo, hipotálamo, corteza y amígdala (Meyerhof, 1998); también puede encontrarse dicho ARNm, aunque mucho más disperso, en el cerebelo y en la médula espinal. En el encéfalo, el ARNm de sst1 puede detectarse en las capas V-VI (Perez y col., 1994) de la corteza cerebral, en la corteza olfativa primaria, en la *taenia tecta*, el subículo, la corteza entorrinal, la capa granular del giro dentado, la amígdala y los núcleos cerebelares. No se han detectado transcritos de dicho receptor en la hipófisis (Tabla 4).

El ARNm del sst2 de rata, ratón y humano fue detectado por Patel y col. (1993), mediante extensión del extremo 3', en la hipófisis, corteza cerebral e hipotálamo. Al igual que en ratón, se han detectado en rata dos transcritos de 2,3 kilobases (kb) y 2,8 kb, respectivamente. El transcrito más pequeño se encuentra principalmente en hipotálamo, mientras que el segundo transcrito se expresa mayoritariamente en órganos periféricos. El sst2 es el subtipo más abundante en el SNC, con un patrón de distribución muy similar al del sst1. Dicho receptor se encuentra en las capas IV-VI de la corteza cerebral, en la *taenia tecta*, el claustró, el núcleo endopiriforme, el *locus coeruleus*, la habénula media,



el subículo, la capa de células granulares del giro dentado del hipocampo, el estriado y la amígdala (Perez y col., 1994) (Tabla 4).

Aunque los niveles más altos de ARNm del sst3 se han encontrado en el cerebelo de la rata (Bruno y col., 1993), se puede encontrar también dicho ARNm en la hipófisis, el bulbo olfatorio, la corteza olfatoria primaria, los islotes de Calleja, la habénula media, la amígdala, la capa granular del giro dentado, el hipocampo, la corteza cerebral y en varios núcleos talámicos y pontinos. Su expresión es muy débil en el estriado y en las células de Purkinje del cerebelo (Perez y col., 1994) (Tabla 4).

El subtipo sst4 se expresa en la mayoría de las regiones del SNC, excepto en el cerebelo (Bruno y col., 1992). Estas regiones cerebrales incluyen la corteza cerebral, especialmente las capas IV y V, el hipocampo, los subcampos CA1 y CA2, el hipotálamo, el estriado y la amígdala (Tabla 4).

El sst5 es el receptor menos extendido de los cinco subtipos. Su transcrito ha sido identificado en la hipófisis, en el hipotálamo y, en menor medida, en la amígdala y el bulbo olfatorio. Hay estudios que demuestran que el ARNm del sst5 puede encontrarse en el área preóptica y en el hipotálamo.

b. Tejidos periféricos

Los ARNm de sst1-sst5 se distribuyen de diferente manera dependiendo del tejido. En los islotes de Langerhans del páncreas endocrino están presentes todos los subtipos de sst, siendo el sst2 el más abundante, al igual que ocurre en las glándulas adrenales. En el músculo esquelético y corazón, el sst4 es el más abundante, mientras que en próstata, el subtipo sst3 es el que se encuentra expresado en mayor cantidad. En ovario, el sst1 es el más ampliamente distribuido (Bruno y col., 1993; Patel y col., 1993; Reisine y Bell, 1995; Patel y col., 1999). Los únicos niveles detectables del transcrito de sst5 se localizan en intestino, páncreas, corazón y bazo (Bruno y col., 1993).

Se ha demostrado la presencia de sst2 en casi todas las células específicas del sistema inmune. Así, se han encontrado sitios de unión específicos para la SRIF en los linfocitos T, tanto activados como sin activar (Krantic, 2000), en células B extraídas de humanos sanos (Scichitano y col., 1987) y en líneas de células B leucémicas (Scichitano y col., 1988). En extractos de timo que contienen tanto timocitos como células epiteliales tímicas, se han encontrado ARNm de los subtipos sst1, sst2 y sst3 (Krantic, 2000).



También se ha demostrado la presencia de ARNm de sst2, sst3 y sst5 en monocitos de ratón (Albini y col., 1999).

Tabla 4. Distribución de los receptores de somatostatina.

	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
ENCÉFALO					
Corteza	++++	++++	++	++	-
Hipocampo	+++	++++	++	+	-
Estriado	+++	+++	++	+	-
Amígdala	++++	++	+++	+	+
Bulbo olfatorio	++	+++	++	++	+
Tálamo	++	++	++	+	-
Hipotálamo	+	++	+	+	++++
Cerebelo	+	-	-	-	+
Hipófisis	++	++	+	+	++++
TEJIDOS PERIFÉRICOS					
Páncreas	-	+	-	-	-
Islotes de Langerhans	++	++++	+	++	+
Glándulas adrenales	+	++++	+	-	-
Intestino	+	-	+	++	++
Corazón	+	+++	+	++++	++
Riñón	-	++	+	++	-
Estómago	+	+	+	+	-
Bazo	++	+	++++	+	+



C. SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACOPLADOS A LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

1. Proteínas G

Las proteínas G tienen un papel primordial en la señalización de la SRIF ya que son las responsables del acoplamiento de los sst a los distintos efectores regulados por la SRIF. Las proteínas G son heterotrómeros que se adosan a la cara interna de la membrana citoplasmática (Gilman, 1987) y que están formadas por una subunidad α con actividad GTPasa, una subunidad β y una subunidad γ , codificadas por distintos genes (Ross, 1989). La subunidad α proporciona la identidad a la proteína G y es la que entra en contacto con el receptor a través de su dominio C-terminal (Birnbaumer y col., 1990). Existen distintos tipos de subunidades α , cuya homología permite clasificar las proteínas G en cuatro subfamilias: G_s , G_i/G_o , G_q y G_{12} . Las subunidades β y γ forman un heterodímero al que se unirá la subunidad α siempre y cuando lleve unido GDP. La asociación entre los tres monómeros es esencial para el acoplamiento funcional entre el receptor de membrana y la proteína G. Además, la unión de la subunidad α al dímero $\beta\gamma$ disminuye la liberación espontánea del GDP (Brandt y Ross, 1985). Cuando se activa el receptor, mediante la unión de un agonista, se produce un intercambio de GDP por GTP en la subunidad α . Dicha unión provoca cambios conformacionales en la subunidad α que favorecen su disociación del dímero $\beta\gamma$. Ambas partes de la proteína G son capaces de activar distintos efectores celulares. La actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α hidrolizará el GTP a GDP, devolviendo la subunidad α a su estado inactivo, favoreciendo de nuevo la unión a $\beta\gamma$. La reasociación del heterotrómero devuelve a la proteína G a su estado inicial (Ford y col., 1998; Wall y col., 1998).

Se ha demostrado que el pretratamiento de distintos tipos de células con toxina pertusis (PTX) bloquea la mayoría de las acciones de la SRIF (Cronin y col., 1983; Reisine y col., 1985a; Reisine y col., 1985b; Lewis y col., 1986; Yajima y col., 1986). Puesto que las proteínas $G_{i\alpha1}$, $G_{i\alpha2}$, $G_{i\alpha3}$, $G_{o\alpha1}$ y $G_{o\alpha2}$ son las que presentan sensibilidad a la PTX, se postuló que éstas serían las responsables de mediar las acciones de la SRIF. Mediante técnicas de inmunohistoquímica, Law y col. (1991) demostraron que en cerebro, los receptores de SRIF se unen específicamente a las proteínas $G_{i\alpha1}$ y $G_{i\alpha3}$. Un estudio posterior demostró que la unión de agonistas a dichos receptores en cerebro



promueve la asociación del receptor con $G_{o\alpha}$ y con $G_{i\alpha 2}$, posiblemente aumentando la afinidad del receptor por estas subunidades α (Law y col., 1992). Por consiguiente, en cerebro, tras la unión de la SRIF a sus receptores, éstos son capaces de acoplarse a todos los subtipos de proteínas $G_{i\alpha}$ y $G_{o\alpha}$.

2. Efectores

a. Adenilato ciclasa

La adenilato ciclasa (AC) es una proteína de la membrana plasmática que convierte el nucleótido adenosín-5'-trifosfato (ATP) en AMPc, un segundo mensajero que regula un gran número de funciones celulares. La actividad de la AC está controlada por receptores estimuladores e inhibidores mediante el acoplamiento de éstos a proteínas G_s o G_i , respectivamente. Hasta la fecha, se han descrito diez isoformas de AC distintas. Nueve de ellas se asocian a membrana, denominadas AC1-AC9, y una isoforma soluble. Las isoformas AC1-AC9 están reguladas por proteínas G, mientras que la isoforma soluble se activa por bicarbonato. Las isoformas AC1, AC3 y AC8 son sensibles a Ca^{2+} -calmodulina, los subtipos AC2, AC4 y AC7 son estimulados por $G\beta\gamma$, mientras que AC5 y AC6 se distinguen por su sensibilidad a la inhibición por Ca^{2+} y por $G_{o\alpha}$, $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$ y $G_{o\alpha}$. Todas las isoformas, salvo la AC9, son estimuladas por forskolina (FK), un diterpeno procedente de la planta *Coleus forskohli* (Premont y col., 1996).

Las isoformas AC1-AC9 poseen dos dominios duplicados de seis segmentos hidrofóbicos cada uno unidos por un largo bucle intracelular, que posee dos dominios de homología denominados C1 y C2. Estos dos dominios constituyen el núcleo catalítico de la enzima. A estos dominios de homología pueden unirse tanto las proteínas G como otras moléculas, por ejemplo, la FK (Sunahara y Taussig, 2002).

La distribución de las isoformas de AC se resume en la Tabla 5. En general, todas las isoformas de AC unidas a la membrana se encuentran en tejidos excitables tales como neuronas y músculo (Sunahara y col., 1996; Hanoune y Defer, 2001). En el cerebro, las isoformas de AC se localizan en distintas regiones del mismo (Xia y col., 1992; Mons y col., 1993; Matsuoka y col., 1997). Aunque la mayoría de las isoformas se expresan ampliamente, las isoformas AC1 y AC3 sólo se expresan en el cerebro (Xia y col., 1992). La AC soluble se expresa principalmente en los testículos, aunque se han identificado



variantes que muestran un patrón de distribución más amplio (Jaiswal y Counti, 2001). La amplia distribución de las isoformas de AC sugiere que cualquier célula contiene múltiples isoformas (Sunahara y Taussig, 2002).

La activación hormonal de la AC ocurre principalmente a través de receptores acoplados a la proteína G_s , mientras que los miembros de la familia G_i inhiben dichas enzimas, mostrando una selectividad para determinadas isoformas de AC. Así, $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$, $G_{0\alpha}$ y $G_{i\alpha z}$ pueden inhibir la AC5 y AC6 (Tabla 5) mientras que $G_{0\alpha}$ puede inhibir la AC1 (y posiblemente AC8), aunque no es tan potente como otras subunidades. Se requiere la miristoilación de las subunidades $G_{i\alpha}$ para la inhibición de AC (Sunahara y Taussig, 2002). También se ha demostrado una regulación de la actividad AC mediada por $G\beta\gamma$, que puede estimular la enzima, como es el caso de AC2, AC4 y AC7, o inhibirla, como ocurre con AC1 y AC8 (Sunahara y Taussig, 2002).

El Ca^{2+} también es capaz de regular la actividad AC. Se ha demostrado que concentraciones milimolares (no fisiológicas) de Ca^{2+} pueden inhibir todos los subtipos de AC existentes. En el rango micromolar, solo se ven inhibidos AC5 y AC6.

Para determinar qué receptores de SRIF se acoplaban a la inhibición de la AC, se utilizaron, en experimentos iniciales, dos análogos de SRIF marcados radioactivamente, el MK678 (que se une específicamente a los subtipos sst2, sst3 y sst5) y el CGP-23,996 (que se une a los subtipos sst1 y sst4), y células GH₃. El MK678 marcado condujo a una inhibición de la acumulación de AMPc similar a la provocada por la SRIF (Raynor y Reisine, 1992). Dicha inhibición se veía reducida cuando las células se trataban con GTP-gamma-S, un análogo no hidrolizable del GTP, lo que sugería que la inhibición de la AC por parte de los sst debía llevarse a cabo a través de proteínas G_i .

Empleando células HEK-293, se demostró que la AC es inhibida por el subtipo sst1 (Moller y col., 2003). Las células transfectadas con sst1 de origen humano mostraban un descenso en la capacidad de inhibir la actividad de la AC cuando se cultivaban en presencia de MK678 o CGP-23,996. Por otro lado, en células transfectadas con $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$, y $G_{i\alpha 3}$ (Strnad y col., 1993), la SRIF inhibió la acumulación de AMPc estimulada por FK. En músculo liso, cerebro y páncreas, así como en distintas líneas celulares transfectadas, se ha demostrado el acoplamiento de sst3 y sst5 a la inhibición de la AC (Meyerhof, 1998).

**Tabla 5.** Localización de las distintas isoformas de adenilato ciclasa de membrana.

Isoforma de AC	Localización tisular	Regulación por subunidades de proteínas G
AC1	Cerebro	Estimulada por: $G_{s\alpha}$
AC2	Médula adrenal	Inhibida por: $G_{\beta\gamma}$, $G_{0\alpha}$
	Cerebro Corazón Músculo esquelético Pulmón	Estimulada por: $G_{s\alpha}$, $G_{\beta\gamma}$
AC3	Cerebro	Estimulada por: $G_{s\alpha}$
AC4	Epitelio olfatorio	Estimulada por: $G_{s\alpha}$, $G_{\beta\gamma}$
	Cerebro Corazón Hígado Pulmón Riñón Útero	
AC5	Cerebro	Estimulada por: $G_{s\alpha}$
	Corazón Glándula adrenal Hígado Pulmón Riñón Útero	Inhibida por: $G_{\beta\gamma}$, $G_{i\alpha}$
AC6	Ubicua	Estimulada por: $G_{s\alpha}$ Inhibida por: $G_{\beta\gamma}$, $G_{i\alpha}$
AC7	Ubicua, altamente expresada en cerebro	Estimulada por: $G_{s\alpha}$ Inhibida por: $G_{\beta\gamma}$
AC8	Cerebro Pulmón	Estimulada por: $G_{s\alpha}$
AC9	Cerebro Músculo esquelético	Estimulada por: $G_{s\alpha}$

La demostración del acoplamiento de sst4 a la AC fue más compleja. Mientras que algunos grupos confirmaban su acoplamiento a la AC (Meyerhof, 1998), otros grupos lo contradecían (Raynor y col., 1993b). Estudios realizados en células transfectadas con el gen del sst4 de humano y de rata mostraban distintas respuestas a los análogos de GTP. Finalmente, fueron Kaupmann y col. (1993) quienes demostraron que el subtipo sst4 inhibe la actividad AC, acoplándose a proteínas G_i , corroborando así los resultados de Demchyshyn y col. (1993).

En conclusión, hoy en día está bien establecido que todos los sst clonados se acoplan a la AC de forma negativa a través de proteínas G_i (Figura 8) (Hoyer y col., 1994; Patel y col., 1994; Patel, 1999).



b. Canales de potasio

Los canales de K^+ se acoplan a los sst a través de una proteína G denominada inicialmente G_K , cuya caracterización posterior reveló que era una proteína $G_{i\alpha 3}$ (Yatani y col., 1990). En 1996, el grupo de Kozasa (Kozasa y col., 1996) demostró que en la línea celular de hipófisis AtT-20, la SRIF estimula la apertura de los canales de K^+ a través de la proteína $G_{i\alpha 2}$. Esta apertura conduce a una salida de iones K^+ , provocando así una hiperpolarización la membrana plasmática. Dicha hiperpolarización conduce a una reducción secundaria de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , por inhibición de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que provoca la inactivación de la PKC, y por consiguiente, la inhibición de la secreción celular. En neuronas de la región CA1 del hipocampo y del núcleo del tracto solitario, esta acción hiperpolarizante de la SRIF se debe a la activación de una corriente de K^+ dependiente de voltaje, denominada corriente M (I_M), que puede bloquearse mediante agonistas muscarínicos (Jaquin y col., 1988). Por ello, hasta la fecha, se cree que tanto $G_{i\alpha 3}$ como $G_{i\alpha 2}$ pueden estar implicadas en la activación de estos canales inducida por la SRIF. Asimismo, se ha sugerido que existe una vía alternativa a través de la cual la SRIF activa los canales de K^+ de manera indirecta. Esta activación indirecta está mediada por la PLA_2 , que es una enzima activada por la SRIF a través de una proteína G_i , lo que provoca la producción de ácido araquidónico y leucotrienos. Se ha observado que ambos metabolitos estimulan los canales de K^+ en neuronas hipocampales y en células de hipófisis de rata (Schweitzer y col., 1990; Alderton y col., 2001).

Se han realizado diversos estudios para determinar los subtipos de sst que se acoplan a los canales de K^+ . En un principio, se sugirió que la activación de los canales de K^+ estaba mediada por $G_{i\alpha 3}$, y que los subtipos sst2 y sst3 se acoplan a dicha proteína; estos dos receptores mediarían los efectos estimulantes de la SRIF sobre la apertura de los canales de K^+ (Yatani y col., 1990). Sin embargo, recientemente se ha observado que en oocitos de *Xenopus* transfectados con los subtipos sst2-sst5, también se activan canales de K^+ . Por el contrario, se ha demostrado que el sst1 inhibe dichos canales (Kreienkamp y col., 1997).

En conclusión, se sugiere que todos los sst, excepto sst1, podrían acoplarse a los canales de K^+ , activándolos.



c. Canales de calcio

Además del efecto indirecto de la SRIF sobre la entrada de Ca^{2+} (por activación de los canales de K^+), la SRIF es capaz de inhibir los canales de Ca^{2+} de tipo L y N, reduciendo el flujo del catión hacia el interior de la célula (Reisine, 1995c). Los sst se acoplan a los canales L a través de una proteína G de la subfamilia G_0 (Reisine, 1995c).

El subtipo sst2 interviene en la regulación de los canales de Ca^{2+} . En un estudio con células hipofisarias GH_12C_1 y F_4C_1 transfectadas con el sst2 humano y con canales de Ca^{2+} de tipo L y N, se observó que la adición de SRIF o del análogo SMS 201-995 inhibía ambas corrientes de Ca^{2+} . Sin embargo, cuando dichas células se transfectaron con el sst1, la entrada de Ca^{2+} no fue inhibida ni por SRIF ni por su análogo (Chen y col., 1990). No obstante, se ha demostrado que en células 1046-38 de insulinoma de rata, el sst1 puede inhibir las corrientes de Ca^{2+} como respuesta al análogo CH-275 (Roosterman y col., 1998). Asimismo, Chen y col. (1997) han demostrado que en células tumorales de hipófisis, tanto el sst1 como el sst2 son capaces de inhibir las corrientes de Ca^{2+} de forma sensible a la PTX. Las subunidades α de las proteínas G implicadas en la regulación de las corrientes de Ca^{2+} incluyen las subunidades α_{0A} , α_{0B} y α_{i2} (Jeong e Ikeda, 2000), aunque se ha demostrado que las subunidades $\beta\gamma$ del heterotrímero son las principales responsables de la regulación por SRIF de los canales N y L de Ca^{2+} (Delmas y col., 1998). También existen trabajos que relacionan el subtipo sst5 con la inhibición de los canales de Ca^{2+} de forma sensible a PTX en células AtT-20 hipofisarias (Tallent y col., 1996).

Como se ha descrito anteriormente, la inhibición de los canales de Ca^{2+} mediada por la unión de la SRIF a sus receptores se produce también de manera indirecta, como consecuencia de la apertura de los canales de K^+ y la consiguiente hiperpolarización. Sin embargo, la SRIF también puede inhibir los canales de Ca^{2+} a través de la vía del AMPc (Tsien y col., 1986). Así, se ha demostrado que la PKA es capaz de fosforilar los canales de Ca^{2+} , provocando la apertura de los mismos. La SRIF, al inhibir la AC, provoca una disminución en los niveles intracelulares del AMPc y, por ende, una menor activación de la PKA. El resultado final es la inhibición de los canales de Ca^{2+} (Figura 8).



d. Vesículas de secreción

La capacidad de la SRIF de disminuir los niveles de Ca^{2+} intracelulares así como los niveles de AMPc explican, en parte, los efectos antiseoretos de la SRIF. Sin embargo, además de estos efectos, denominados efectos proximales, la SRIF también es capaz de inhibir la secreción de hormonas estimulada directamente por AMPc, ionóforos de Ca^{2+} , agonistas de los canales de Ca^{2+} o por el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DAG) y Ca^{2+} extracelular (Patel, 1999). Todos estos hallazgos indican que la SRIF es capaz de inhibir la secreción hormonal mediante un efecto distal sobre el proceso de exocitosis, independientemente de los efectos que produce sobre el AMPc o sobre el Ca^{2+} . El mecanismo por el cual la SRIF inhibe la exocitosis es dependiente de GTP y sensible a PTX, lo que sugiere la existencia de una proteína G junto al lugar donde se produce la exocitosis, acoplada a los sst (Luini y De Matteis, 1990). Recientemente, se ha observado que esta inhibición de la exocitosis se produce por la activación de una proteína fosfatasa dependiente de Ca^{2+} denominada calcineurina (Gromada y col., 2001). En células α pancreáticas de rata, se ha demostrado que la supresión de la exocitosis por SRIF está mediada por $\text{Gi}\alpha_2$, dado que anticuerpos contra dicha proteína bloquean la acción inhibitoria de la SRIF (Gromada y col., 2001). Estudios recientes sugieren que sst2 podría ser el subtipo que media dicha inhibición (Kramer y col., 2005).

e. Fosfotirosina fosfatasas

Las fosfotirosina fosfatasas (PTPs) son, desde hace años, el punto principal de la investigación de los efectos antiproliferativos de la SRIF. Las PTPs son enzimas que desfosforilan las proteínas tirosina quinasas y modulan las cascadas de las MAPK. En 1985 se describió, por primera vez, la sensibilidad de las PTPs a la SRIF (Hierowski y col., 1985). Las PTPs que se asocian a los efectos antiproliferativos de la SRIF son aquellas que poseen un dominio *src2*, es decir, las PTPs citosólicas: SHP1 (SHPTP-1, syp, PTP1D) y SHP2 (SHPTP-2, PTP-1C).

En células COS-7 transfectadas con sst1 y sst2 de humano, se ha demostrado un incremento muy rápido de la actividad PTP cuando se añaden los análogos SMS 201-995 o RC-160, mientras que el RC-160 es capaz de estimular de forma significativa la actividad PTP en células que expresan únicamente el sst1 (Buscail y col., 1994). Además,



en células CHO-K1 transfectadas con *sst1*, se demostró que esta estimulación de las PTPs es sensible a la PTX, lo que sugiere que está mediada por proteínas G (Pan y col., 1992). En las células CHO-K1 transfectadas con *sst2*, el efecto del RC-160 sobre la proliferación celular fue inhibido por ortovanadato (Buscail y col., 1995), lo que demuestra que el receptor *sst2* también media la acción de la SRIF sobre las PTPs. En células CHO-K1 transfectadas con el subtipo *sst5* de rata, también se ha demostrado un acoplamiento de dicho subtipo a la activación de las PTPs, inhibiendo la proliferación celular inducida por suero fetal bovino (SFB).

Se considera que, entre los tres subtipos de *sst* que modulan la acción de la SRIF sobre las PTPs, el *sst2* es el receptor más importante. Raully y col. (1996) demostraron que el *sst2* activa constitutivamente la expresión de SHPTP-1 en células NIH-3T3. Cuando se tratan dichas células con ortovanadato o con oligonucleótidos antisentido específicos de SHPTP-1, se observa un descenso en la inhibición de la proliferación celular mediada por *sst2*. Cuando se coprecipitan receptor y efector, la activación del *sst2* da lugar a un rápido desacoplamiento de SHPTP-1, acompañado de un incremento en la actividad catalítica. En células control, el SHPTP-1 fosforila residuos de tirosina mientras que la SRIF induce una desfosforilación de estos residuos de forma rápida y transitoria (López y col., 1997). La PTX bloquea la estimulación de SHPTP-1 mediada por SRIF, lo que implica la participación de alguna proteína G. Estudios de coimmunoprecipitación en células CHO-K1 que coexpresan *sst2* y SPH-1 indican que la proteína G implicada probablemente sea la $G_{i\alpha 3}$, ya que ésta coimmunoprecipita en presencia de anti-*sst2* y anti-SHP1 (López y col., 1997). Por otro lado, se ha descrito que SHP-2 se acopla a los subtipos *sst2*, *sst3* y *sst4* en membranas de células NIH-3T3 (Reardon y col., 1997) mientras que Florio y col. (1999) afirman que la estimulación de *sst1* también activa a la SHP-2 en células CHO-K1.

Además de los efectos citostáticos de la SRIF, se han observado efectos apoptóticos (Srikant, 1995; Sharma y Srikant, 1998). Así, el análogo SMS 201-995 induce apoptosis en células MCF7 de cáncer de mama humano, que se bloquea por ortovanadato, lo que indica que dicha apoptosis está mediada por una PTP que se activa con la llegada de la señal proapoptótica (Sharma y Srikant, 1998). En células CHO-K1, en las que los receptores pueden expresarse individualmente, se ha demostrado que el *sst3* está implicado en esta señalización (Sharma y col., 1996).



El bloqueo de los efectos apoptóticos mediados por la unión de la SRIF a sst5 en células CHO-K1, utilizando ortovanadato o PTX, es consecuencia de la activación de p53, cuyos niveles están aumentados en los procesos de muerte celular programada y no requiere la detención del ciclo celular en la fase G1. Sin embargo, en células CHO-K1, que expresan el resto de subtipos de sst, la activación de p53 que media la apoptosis activada por SRIF sí requiere la detención del ciclo en G1 (Sharma y col., 1999).

f. Proteínas quinasas activadas por mitógenos

Todos los sst se acoplan a las MAPK (Patel, 1999), generalmente vía PTPs. Aunque la SRIF induce una inhibición de la proliferación celular, aún se desconoce si sus receptores activan o inhiben la cascada de las MAPK. Así, en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, que expresan el sst2, la SRIF provoca una inhibición en la actividad MAPK y, por lo tanto, una inhibición de la proliferación celular (Cattaneo y col., 1996). El ortovanadato bloquea este efecto, lo que indica que la inhibición de la MAPK mediada por SRIF se produce a través de PTPs (Figura 8). En células NIH3733, se ha demostrado que el sst3 también inhibe la actividad MAPK vía PTPs, ya que al desfosforilar la proteína Raf-1 disminuye la actividad MAPK (Reardon y col., 1996) (Figura 8). Sin embargo, se ha demostrado que el sst5 disminuye la actividad MAPK mediante inhibición de la guanilato ciclasa (GC) (Cordelier y col., 1997) e independientemente de PTPs. Por otro lado, la activación de MAPK vía sst también es capaz de inhibir la proliferación celular, como ocurre en células CHO-K1 tras la estimulación de sst1 (Florio y col., 1999). Se han postulado también acciones duales. La activación de sst3 en células de insulinoma de ratón, por ejemplo, conlleva la activación transitoria de la actividad MAPK, que decae inmediatamente después (Yoshitomi y col., 1997).

En conclusión, dependiendo del tipo de sst que se estimule y del tipo celular en el que se exprese dicho receptor, puede producirse tanto una activación como una inhibición de la actividad MAPK, con el resultado de una inhibición de la proliferación celular dependiente de PTPs.

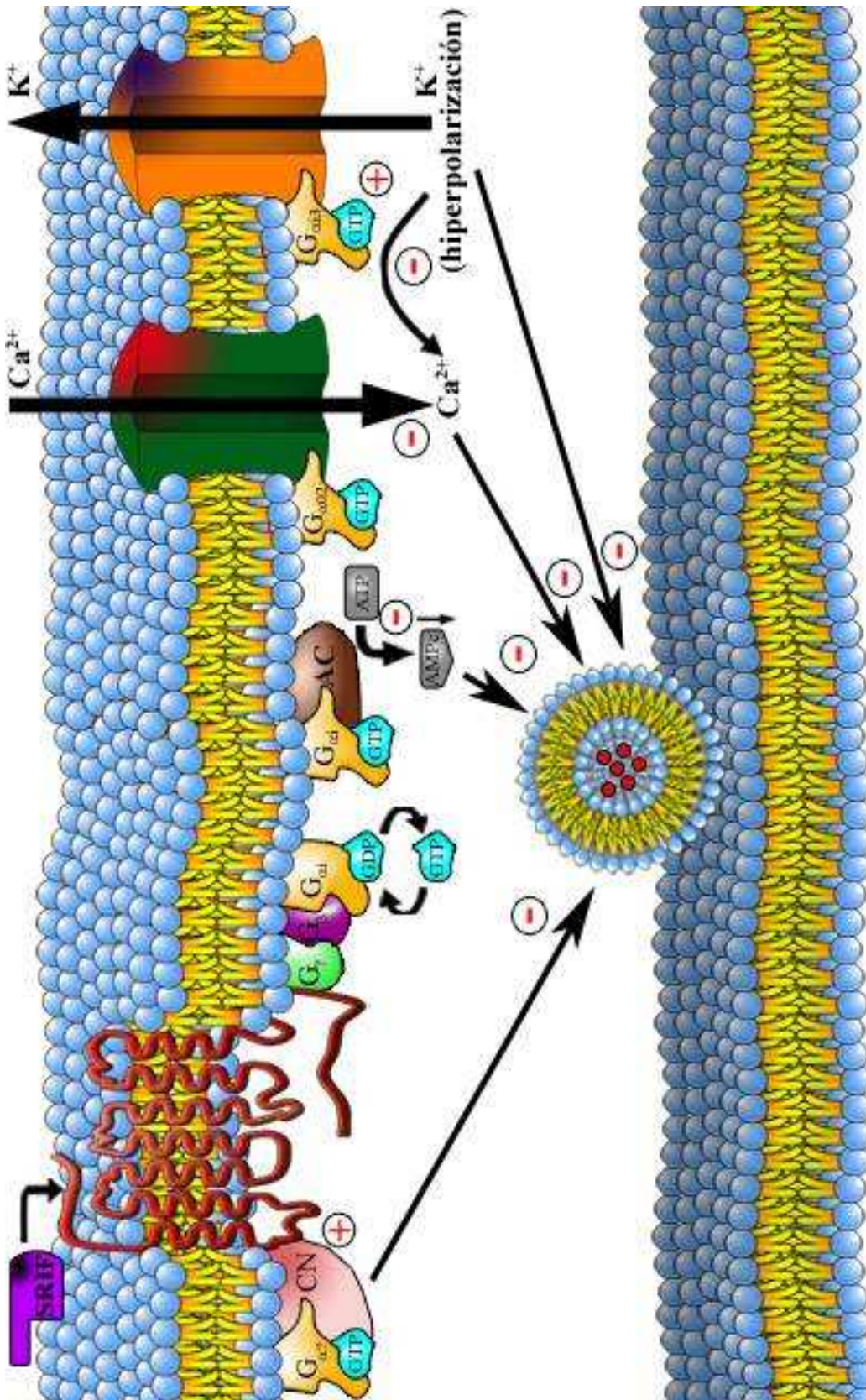


Figura 8. Sistemas de transducción de señales acoplados a los receptores de somatostatina.



g. Bomba de Na^+/H^+

La activación de los sst puede desembocar en una acidificación del medio intracelular. En 1999, Thangaraju y col. demostraron que dicha acidificación desempeña un papel importante en las rutas de muerte celular. Estos cambios en el pH celular son dependientes de la concentración de Na^+ extracelular e independientes de la estimulación de la actividad AC mediada por FK (Barber y col., 1992). La inhibición de proteínas G mediante el uso de PTX es incapaz de bloquear el intercambio de Na^+/H^+ , lo que indica que dicho efecto no está mediado por proteínas G_i/G_0 . Sin embargo, los resultados obtenidos mediante microfisiometría muestran que la regulación de la actividad de la bomba Na^+/H^+ es más compleja de lo que parece. Mediante el uso de células CHO-K1 transfectadas con el sst4 humano, Smalley y col. (1998) demostraron que la SRIF acidifica el pH intracelular de forma dependiente de dosis, y que la PTX bloquea dicha respuesta a la SRIF. Por lo tanto, sst4 debe regular la activación de la bomba Na^+/H^+ a través de alguna proteína G_i/G_0 . En células CHO-K1 transfectadas con el sst2A o sst2B, la estimulación de dichos receptores con SRIF también reduce el efecto de la misma sobre la velocidad de reducción del pH intracelular (Schindler y col., 1998). Utilizando un microfisiómetro, Chen y Tashjian (1999) identificaron distintas rutas de transducción moduladas tanto por sst1 como sst2 en células F_4C_1 . En las células transfectadas con sst1, la estimulación con SRIF indujo una reducción en la velocidad de reducción del pH de forma dependiente de la dosis. Cuando las células se transfectaron con sst2, la SRIF provocó una respuesta bidireccional en la velocidad de reducción del pH extracelular, es decir, un rápido aumento de este parámetro seguido por un descenso por debajo del nivel basal. Cuando las células se trataron con PTX, sólo se bloqueó la reducción en la velocidad de reducción del pH extracelular mediada por sst2 (Chen y Tashjian, 1999).

En definitiva, los sst están acoplados funcionalmente a la bomba de Na^+/H^+ , aunque la transducción de la señal tiene lugar mediante rutas distintas. La activación de la bomba resistente a PTX sólo se ha observado en receptores sst1, mientras que los subtipos sst2 y sst4 parecen acoplarse de forma sensible a PTX a la activación de dicha bomba a través de proteínas G_i/G_0 .

h. Fosfolipasa C

La hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) por una fosfolipasa C (PLC) específica es uno de los primeros pasos en la regulación de



diversas funciones celulares. Dicha hidrólisis da lugar a la formación de dos segundos mensajeros intracelulares, el DAG y el IP₃. El IP₃ se une a receptores intracelulares específicos, situados en depósitos de Ca²⁺ intracelulares no mitocondriales, provocando la liberación de Ca²⁺ de dichos depósitos. El DAG, junto con el Ca²⁺ liberado, activa la PKC (Berridge, 1993). Hasta el momento, se han identificado 10 subtipos de PLC que se agrupan en 3 familias: PLC-β, PLC-γ y PLC-δ (Rhee y Choi, 1992).

En cerebro, nuestro grupo de investigación (Muñoz-Acedo y col., 1995) así como otros autores (Lachowicz y col., 1994) han demostrado que la SRIF induce un aumento de los niveles de IP₃, mientras que en los islotes pancreáticos se ha observado el efecto contrario (Malm y col., 1991). Lachowicz y col. (1994) y Muñoz-Acedo (1995) han demostrado que la SRIF aumenta la concentración de IP₃ en homogenados de hipófisis, hipocampo y corteza cerebral. También se ha observado que la SRIF provoca la movilización de Ca²⁺ en células que expresan sst nativos, como son cultivos de astrocitos procedentes de estriado (Delumeau y col., 1992).

Todos los sst humanos transfectados en células COS-7 median la activación de la PLC a través de mecanismos sensibles a la PTX cuando son estimulados con bajas concentraciones de SRIF (Tomura y col., 1994). A altas dosis de SRIF, los subtipos sst2, sst3 y sst5 son capaces de estimular la PLC, pero a través de vías insensibles a PTX. Estos datos indican que los cinco sst se acoplan preferentemente a proteínas G_i/G₀ a bajas concentraciones de SRIF pero que sst2, sst3 y sst5 pueden acoplarse a la proteína G_q a altas dosis del péptido para activar la PLC. En células CHO transfectadas con sst1, la SRIF también estimula la formación de IP₃, siendo este efecto bloqueado por PTX (Kubota y col., 1994).



Tabla 6. Acoplamiento de los receptores de somatostatina a distintos efectores.

Receptor	Proteína G	Efector
<i>sst1</i>	G α i	(-) AC (-) Canales de K ⁺
	G α 0/G α i2/G β γ Sensible a PTX	(-) Canales de Ca ²⁺ (+) PTPs (-) MAPK (+) PLC
	Resistente a PTX	(+) Bomba Na ⁺ /H ⁺
<i>sst2</i>	G α i	(-)AC
	G α 3	(+) Canales K ⁺ (+) PTPs
	G α 0/G α i2/G β γ Sensible a PTX	(-) Canales de Ca ²⁺ (-) MAPK (+) PLC
<i>sst3</i>	Gi/G0	(+) Bomba Na ⁺ /H ⁺
	Gq	(+) PLC
	G α i	(-) AC (-) Canales de Ca ²⁺
<i>sst4</i>	G α 3	(+) Canales K ⁺ (+) PTPs (-) MAPK
	Sensible a PTX	(+) PLC
	Gq	(+) PLC
<i>sst5</i>	G α i	(-)AC (+) Canales de K ⁺ (-) Canales de Ca ²⁺
	Sensible a PTX	(+) PTPs (-) MAPK (vía (-)GC) (+) PLC
	Gq	(+) PLC

PTX: toxina pertusis; PLC: fosfolipasa C; PTP: fosfotirosina fosfatasa; AC: adenilato ciclasa;
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; GC: guanilato ciclasa.



D. SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO Y SISTEMA INMUNE

1. Células inmunes productoras de SRIF

Se ha demostrado que en ratones las células inmunes presentes en las zonas de inflamación secretan SRIF-14 (Eaton y col., 2001). Mediante análisis por RT-PCR, se ha demostrado que las líneas celulares derivadas de macrófagos p388D1, J774 y RAW 264.7 poseen grandes cantidades del ARNm de la preproSRIF (Elliott y col., 1999), mientras que dicho mensajero no se encuentra en diferentes líneas de células T o células B (Fox y col., 2000). Asimismo, se ha encontrado ARNm de SRIF en el bazo de ratones deficientes en células B y T. Todos estos datos parecen indicar, por tanto, que son los macrófagos los responsables de esta secreción de SRIF-14. La expresión del mensajero de la preproSRIF en los macrófagos de las zonas inflamatorias está mediada por la producción de interleuquinas proinflamatorias. Células de bazo activadas por IFN γ o IL-10 contienen ARNm del precursor de la SRIF-14 y la SRIF-28 (Weinstock y Elliot, 1998).

Se ha detectado la presencia tanto de la SRIF-14 como de la SRIF-28 en los órganos linfoides (bazo y timo) de ratas macho, utilizando anticuerpos que reconocen ambos péptidos (Aguilar y col., 1991). Concretamente, se ha encontrado SRIF-IR en las proximidades de las terminaciones nerviosas localizadas en estos órganos linfoides (Felten y col., 1985). Se ha demostrado también que los linfocitos procedentes de bazo de rata secretan SRIF-14 *in vitro* (Aguilar y col., 1996). Por otro lado, se ha comprobado que los macrófagos activados por infección de *Schistosoma mansoni* aislados a partir de granulomas de ratón producen SRIF-14 (Weinstock y col., 1990).

En el timo, aunque se ha encontrado SRIF, aún está sin determinar el tipo celular responsable de su producción (Krantic, 2000). Estudios recientes realizados en cultivos de células epiteliales de timo humano han revelado, mediante análisis por RT-PCR, ARNm de SRIF, lo que sugiere que estas células podrían ser las responsables de la secreción de SRIF en el timo (Ferone y col., 1999). Otros estudios (Weinstock y Elliott, 2000) muestran una sobreproducción de ARNm de preproSRIF en células dendríticas y epiteliales de timo de ratón, donde es imprescindible para la correcta maduración de las células T. Los mismos autores (Elliott y col., 1998) encontraron el ARNm de la preproSRIF en células aisladas de granulomas.



2. Receptores de somatostatina en células inmunes

Hace más de 30 años, Bhathena y col. (1981) demostraron la presencia de sitios de unión de SRIF en células mononucleares de sangre periférica en humanos. Usando SRIF marcada radiactivamente y análisis de Scatchard, mostraron que poblaciones celulares enriquecidas en linfocitos y poblaciones celulares enriquecidas en monocitos contienen varios cientos de sitios de unión por célula. Desde entonces, se ha identificado la presencia de sitios de unión para SRIF en varios tejidos y células inmunes y hematopoyéticos, por medio de distintas técnicas. Por medio de autorradiografía de SRIF (unión de SRIF u octreótido marcados radiactivamente a secciones de tejido), se revela la presencia de sst en diferentes áreas de tejidos linfoides. De este modo, se ha demostrado la expresión de sst en tejido linfoide normal, incluyendo el tejido linfoide asociado al estómago, timo, bazo y nódulos linfáticos (Reubi y col., 1993a; Reubi y col., 1993b). Los sst se localizan principalmente en los centros germinales de los folículos linfoides y, más difusamente, en la pulpa roja del bazo y la médula del timo.

Los estudios de unión de radioligando demostraron que los sst están presentes en líneas celulares linfoides y de mieloma (Nakamura y col., 1987; Sreedharan y col., 1989). Usando tanto unión por radioligando como SRIF marcada con fluorescencia, se han detectado sitios de unión a SRIF en linfocitos periféricos activados por mitógenos (Hiruma y col., 1990). Más del 95% de las células en todas las subpoblaciones estudiadas (tanto linfocitos T como linfocitos B) se marcaron con el derivado fluorescente de la SRIF. En células mononucleares de sangre periférica sin activar, glóbulos rojos y granulocitos no se han detectados sitios de unión para SRIF mediante ensayos por radioligando (Hiruma y col., 1990). En este mismo estudio, células leucémicas humanas mostraron contener sitios de unión para SRIF.

La expresión de sst puede ser detectada *in vivo*. Tras inyectar octreótido marcado radiactivamente, el ligando se une a sus receptores, pudiendo visualizarse de esta manera los tejidos con más alta densidad de sst (sst2, sst5 y, probablemente, sst3). Esta técnica se ha utilizado para visualizar tumores neuroendocrinos (Krenning y col., 1993). Además, se ha demostrado que en varios trastornos del sistema inmune, incluyendo linfomas malignos (enfermedad de Hodgkin y linfomas no-Hodgkin), enfermedades granulomatosas (tuberculosis, sarcoidosis y síndrome de Wegener) y otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Van Hagen y col., 1993; Van Hagen y col.,



1994a; Van Hagen y col., 1994b; Van den Anker-Lugtenburg y col., 1996), se expresa una alta densidad de sst, permitiendo su visualización mediante esta técnica. Por otro lado, entre los tejidos linfoides normales, sólo el bazo muestra un marcaje intenso con ocreótido radiactivo. El timo y los nódulos linfáticos no se visualizan (Reubi y col., 1993a).

Puesto que la SRIF se une a todos los subtipos de sst clonados hasta la fecha con alta afinidad y que no existen análogos específicos para cada subtipo de receptor, los estudios de unión de radioligandos no dan suficiente información sobre qué sst se expresan en las distintas células inmunes. Los estudios de RT-PCR tampoco muestran resultados uniformes. Sin embargo, se ha demostrado que el subtipo sst2 es el subtipo más expresado entre las líneas celulares de leucemia y en distintas líneas linfoides y de mieloma (Tsutsumi y col., 1997). Todas las líneas celulares analizadas también expresan sst3 y solo algunas mostraron presencia de sst4, sst5 o ambos. En la línea celular linfoide Jurkat se detectó el ARNm de sst2, sst3, sst4 y sst5 pero no del sst1. En el mismo estudio, se demostró la presencia apenas detectable de ARNm de sst2 en células mononucleares de sangre periférica sin activar, mientras que dicho ARNm se expresaba ampliamente en dicha línea celular tras activación con fitohemaglutinina, así como en linfocitos transformados por el virus de Epstein-Barr. En otros estudios, realizados sobre líneas linfoides derivadas de linfocitos B y linfocitos T, sólo se detecta el ARNm de sst2 (Van Hagen y col., 1999). En células de timo de rata en cultivo, se ha demostrado la presencia de los ARNm de sst1 y sst2 (Sedqi y col., 1996). En este estudio, la expresión de sst1 se vio aumentada tras estimular los timocitos con fitohemaglutinina e IL-1. Las células microgliales de rata muestran los ARNm de sst2, sst3 y sst4 (Feindt y col., 1998).

La expresión de ARNm de estos receptores por parte de estas células no indica necesariamente que la proteína de los sst esté presente en su superficie. Así pues, aún no se conoce que subtipos de sst son responsables de la unión de la SRIF a las células inmunes. Se ha investigado recientemente la localización del subtipo sst2 en tejido procedente de biopsias de pacientes con enfermedades con alteraciones del sistema inmune utilizando un anticuerpo dirigido contra un epítipo conservado del extremo C-terminal del receptor sst2. Así, se ha encontrado la expresión de sst2 en células endoteliales y capilares de las proximidades de los infiltrados de células mononucleares presentes en la mucosa gastrointestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria



intestinal, así como en una población de células de estirpe monocito/macrófago (ten Bokum y col., 2000). En pacientes con enfermedades granulomatosas como la sarcoidosis o el síndrome de Wegener, la expresión de sst2 se asocia a células fagocíticas presentes en los granulomas (ten Bokum y col., 1999). Por otro lado, se ha demostrado que las células T aisladas de zonas inflamatorias y de granulomas expresan el ARNm del sst2 (Kimata y col., 1993; Blaser y Parsonet, 1994). Cuando se extrae el granuloma entero y se elimina la población de linfocitos T de dicho granuloma, el nivel del ARNm del sst2 cae en un 50%. Esto sugiere que otras células tales como macrófagos y células B activadas, expresan también el subtipo 2 de receptor de SRIF.

3. Efectos de la somatostatina sobre el sistema inmune

Se han descrito numerosos efectos de la SRIF sobre las células inmunes, tanto *in vivo* como *in vitro*. Es difícil comparar estos estudios, ya que los experimentos se realizaron en células procedentes de distintos animales y bajo condiciones experimentales muy diferentes. Muchas veces se ha observado la inhibición de una respuesta a concentraciones bajas de SRIF (rango nM) (Payan y col., 1984) y la estimulación de la misma a concentraciones altas de SRIF (rango μM) (Fais y col., 1991). Esta respuesta bifásica parece ser característica de la interacción de distintos neuropéptidos con las células inmunes (Agro y Stanis, 1995), y puede tener una explicación fisiológica. Así, las concentraciones más bajas (10^{-12} - 10^{-10} M) son características de neuropéptidos circulantes en sangre, mientras que las concentraciones más altas (10^{-7} - 10^{-6} M) se encuentran en las terminaciones nerviosas (Stanisz y col., 1986). Los efectos diferenciales pueden deberse a la activación de diferentes clases de receptores con alta o baja afinidad por el ligando o a la modulación de la actividad o densidad de los receptores. Los estudios más recientes muestran que la SRIF puede tanto inhibir como estimular la proliferación de linfocitos tanto en humanos (Nordlind y col., 1985) como en roedores (Krcó y col., 1986a). En los linfocitos B la respuesta a la SRIF es siempre inhibidora, o no existe respuesta alguna (Krcó y col., 1986a; Isihara y col., 1999).

En conjunto, las acciones de la SRIF sobre la secreción de interleuquinas en el sistema inmunitario son generalmente inhibidoras (Weinstock y Elliot, 2000). Aunque los linfocitos no son células endocrinas y el papel exacto del AMPc en la secreción de las interleuquinas aún no se entiende por completo, es posible que los mecanismos de inhibición mediados por la SRIF dependan al menos en parte de la inhibición de la



actividad AC de forma similar a la de las células neuroendocrinas. Aún así, debemos pensar en la actividad de otros segundos mensajeros, como podría ser el Ca^{2+} . Este puede ser de interés debido a su implicación en la inhibición de la secreción neuroendocrina provocada por la SRIF (Patel, 1999) y a su papel crítico en la modulación de la respuesta de los linfocitos T y B a la estimulación antigénica.

a. Inhibición de la proliferación de linfocitos

La inhibición de la proliferación de células linfoides es el efecto mejor documentado de la SRIF sobre la función del sistema inmune. La importancia de la SRIF endógena en la regulación de la proliferación de las células inmunes fue puesta de manifiesto por Aguilar y col (1996). Estos autores mostraron que un oligonucleótido antisentido diseñado para bloquear la traducción del ARNm de la SRIF estimulaba la proliferación espontánea de esplenocitos de rata *in vitro*. Los efectos más claros se producen cuando se utilizan líneas celulares derivadas de linfocitos T o linfocitos T purificados (Payan y col., 1984) o cuando se estimula con concanavalina A o lipopolisacáridos (Krcó y col., 1986b; Casnici y col., 1997). Estos estudios, realizados utilizando SRIF nativa, muestran una respuesta inhibitoria. Cuando se utiliza el análogo BIM23014c (lanreótido) sobre linfocitos de ratón, la inhibición de la proliferación tiene la misma eficiencia que cuando se utiliza el péptido nativo (Agro y col., 1991). Estos resultados sugieren que el efecto antiproliferativo que ejerce la SRIF sobre los linfocitos T podría estar mediado por sst2, sst5 o sst3.

La inhibición mediada por SRIF de la proliferación de otros tipos celulares distintos a los linfocitos T, como los monocitos, podría tener un papel modulador sobre la respuesta inflamatoria (Takeba y col., 1997). Un estudio reciente muestra que la proliferación de células mononucleares de sangre periférica humana estimulada por fitohemaglutinina es inhibida tras la administración del octreótido y también por un análogo con alta selectividad para el sst5 (Atiya y col., 1997).

El receptor sst2 es el subtipo de sst mas implicado en la inhibición de los procesos proliferativos de las células inmunes mediada por SRIF, aunque se ha demostrado que la inhibición de la proliferación de la línea Jurkat de linfocitos T humanos está mediada por sst3 (Cardoso y col., 1998). En células tumorales de páncreas humano y en la línea NIH 3T3, derivada de fibroblastos de ratón, se ha comprobado que la activación del sst2 incrementa la tasa de transcripción del gen de la SRIF, induciéndose así un bucle de



retroalimentación autocrina con efectos antiproliferativos (Raully y col., 1996; Delesque y col., 1997), aunque este mecanismo no se ha comprobado en ningún tipo celular del sistema inmune.

b. Efectos de la somatostatina sobre la función de los linfocitos T

Además de los efectos antiproliferativos, la SRIF ha demostrado ser capaz de ejercer diferentes funciones sobre los linfocitos T activados. Una de ellas es la modulación de la secreción de citoquinas. En células mononucleares de sangre periférica humana y en granulomas de ratón, se ha demostrado que la SRIF disminuye la secreción de IFN γ (Muscettola y Grasso, 1990; Blum y col., 1998). Cuando se bloquea esta inhibición mediante la adición de sustancia P o se bloquea específicamente el subtipo sst2, la concentración de IFN γ vuelve a aumentar (Blum y col., 1992). Estos datos sugieren que la regulación de la secreción de IFN γ mediada por SRIF se realiza vía sst2. Este hecho tiene una gran importancia en la respuesta inmune que se produce en la EM/EAE, ya que el IFN γ media la activación de los macrófagos/microglia, la secreción de anticuerpos por parte de células B activadas, la presentación de antígenos a las células Th y el desarrollo de éstas (Weinstock y Elliot, 2000). Dicha inhibición se realiza selectivamente, puesto que el tratamiento con SRIF no disminuye la secreción de otras citoquinas tales como la IL-4, TNF- α o el TGF- β , que en su mayoría dependen de otros subtipos celulares (Arimura y col., 1975).

La sobreproducción de IFN γ que ocurre en los granulomas estimula la expresión del ARNm de la preproSRIF en los macrófagos presentes (Elliott y col., 1999). Se ha demostrado que la SRIF estimula la adhesión de linfocitos T humanos a la fibronectina (Levite y col., 1998). Esto sugiere que la SRIF podría estar modulando, de algún modo, el tráfico de linfocitos T a través de las paredes de los vasos sanguíneos. Así, es posible que la sobreexpresión de IFN γ en los vasos sanguíneos de la BHE aumente la adhesión de las células T a las células endoteliales que componen dicha barrera, lo que podría conducir a una mayor extravasación de los linfocitos T hacia el tejido nervioso.

c. Efectos de la somatostatina sobre la función de los linfocitos B

La SRIF también actúa sobre la secreción de autoanticuerpos anti-PBM. En las células B activadas, la SRIF tiene capacidad para inhibir la producción de IgG (Martinez y col., 1998), IgA e IgM (Isihara y col., 1999). Esta reducción es dependiente de la



concentración de SRIF (Scicchitano y col., 1988). Se ha demostrado recientemente, que en células de granuloma de ratón que hiperproducen IgG2a, el tratamiento con SMS-201-995, se suprime por completo la producción de IgG2a (Aguilar y col., 1996), pero no así la de IgG1 o IgM. En las células B autorreactivas, la producción de IgG2a está mediada por la estimulación por IFN γ (Aguilar y col. 1996; Atiya y col., 1997), por lo que el efecto inhibitor de la SRIF sobre la secreción de la IgG2a podría deberse al efecto de la SRIF sobre el IFN γ , cuyo papel en la activación de las células B es clave (Blum y col., 1993). Esta respuesta está mediada por linfocitos Th activados, ya que en ausencia de estos, la SRIF no puede ejercer esta supresión de la secreción de anticuerpos (Weinstock y Elliot, 2000).

En ratas tratadas *in vivo* con SRIF, el número de células plasmáticas específicas de antígeno durante una respuesta inmune primaria disminuyó significativamente (Eglezos y col., 1993), apuntando de nuevo a que la SRIF tiene un papel primordial en la activación, proliferación y diferenciación de las células B. Experimentos *in vitro* demuestran que el tratamiento con el octreótido en células B de sangre periférica humana reduce el número de células plasmáticas derivadas de los linfocitos B, lo que sugiere que los subtipos de receptores sst2, sst3 o sst5 podrían estar implicados en este proceso de diferenciación (Scolnik y col., 1996).

d. Efectos de la somatostatina sobre la función de monocitos y macrófagos

La SRIF influye en la actividad de células de la estirpe monocito-macrófago, aunque existen algunas contradicciones en la forma en que influyen sobre ella. La SRIF es capaz de inhibir los procesos de quimiotaxis en monocitos de sangre periférica humana y en macrófagos de ratón, en un proceso independiente de la concentración de SRIF (Wiedermann y col., 1993; Ahmed y col., 1998). Sin embargo, existen estudios que no detectan una inhibición significativa de la quimiotaxis (Sacerdote y col., 1990; ten Bokum y col., 2000) ni con SRIF ni con octreótido.

También existen contradicciones sobre la modulación por SRIF de la secreción de citoquinas en monocitos y macrófagos. En monocitos activados de sangre periférica, se ha comprobado que la SRIF es capaz de inhibir la secreción de otras interleuquinas proinflamatorias, tales como la IL-4, la IL-6 o el TNF- α (Peluso y col., 1996). Sin embargo, hace relativamente poco tiempo que se ha comunicado que en monocitos activados, la SRIF también podría activar la secreción de la IL-6 (Komorowski y Stepień,



1995) o del TNF- α (Hernanz y col., 1996) en estas células. La razón por la que existen estas diferencias entre ambos grupos se debe a la concentración de SRIF administrada. La estimulación de la secreción de TNF- α se produjo a una concentración muy baja de SRIF (10^{-11} M), mientras que la reducción de la producción del TNF- α se observó en presencia de concentraciones mayores de SRIF (10^{-9} - 10^{-5}).

e. Efectos de la somatostatina en enfermedades inflamatorias crónicas

El papel de la SRIF como agente antiinflamatorio en patologías autoinmunes como la artritis reumatoide ha sido extensamente estudiado. La inflamación neurogénica, que es inducida por la liberación de neuropéptidos tales como la sustancia P, sugiere que estos neuropéptidos juegan un papel importante en la inducción y mantenimiento de la inflamación. La SRIF es capaz de inhibir la liberación de dichos neuropéptidos (Szolcsanyi y col., 1998a; Szolcsanyi y col., 1998b). Por otro lado, se ha demostrado que la inyección de SRIF en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide reduce el dolor articular y el exudado sinovial (Coari y col., 1995; Matucci-Cerinic y col., 1998). El efecto analgésico de la SRIF podría estar mediado por la reducción de la extravasación de leucocitos (Karalis y col., 1994). La reducción del exudado sinovial por medio de la SRIF ha sido comprobada en un modelo de artritis en conejos. Se ha demostrado que la administración de BIM23014 a ratas con artritis inducida por adyuvante reduce la gravedad de la misma (Rees y col., 1989), mientras que la administración del octreótido no reduce los síntomas (ten Bokum y col., 1999), lo que sugiere que es el receptor sst1 o sst4 el implicado en la inhibición de estos procesos.

En cuanto a la EAEa en sí, se ha comprobado que la administración sistémica de SRIF u octreótido retrasa la aparición de los síntomas de la EAE, aunque no queda claro si estos efectos se deben a una acción inmunomoduladora del octreótido (Muhvic y col., 1992).

Objetivos

- *¿Un hombre puede ser valiente cuando tiene miedo?*
 - *Es el único momento en que puede ser valiente.*
- Bran y Eddard Stark.



En pacientes con EM así como en su modelo experimental, la EAE aguda, se han demostrado los siguientes datos:

- 1.- Los pacientes con EM presentan un bajo contenido del tetradecapéptido SRIF en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en las recidivas de la enfermedad, recuperando sus niveles durante las remisiones (Vecsei y col., 1990; Maeda y col., 1994; Roca y col., 1999). Estos resultados sugieren que la liberación de SRIF al LCR depende de la actividad de la enfermedad.
- 2.- Tanto la EM como su modelo animal, la EAE, son trastornos neuroinflamatorios y está bien establecido que la SRIF tiene efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y neurotróficos (Muhvic y col., 1992; Atiya y col., 1997; Takeba y col., 1997; Martínez y col., 1998; Scicchitano y col., 1998; Isihara y col., 1999).
- 3.- Existen receptores específicos de SRIF en células del SNC implicadas en ambos trastornos (Bhathena y col., 1981; Reubi y col., 1993a; Reubi y col., 1993b; Tsutsumi y col., 1997; Feindt y col., 1998; Van Hagen y col., 1999).
- 4.- La SRIF inhibe la liberación de interleuquina 6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por macrófagos (Peluso y col., 1996), factores ambos elevados en la EM y en la EAE.
- 5 – Recientemente, se han descrito lesiones neurodegenerativas en el hipocampo de pacientes con EM y en animales con EAE (Brownell y Hugues, 1962; Lumsden, 1970; Kidd y col., 1999; D’Intino y col., 2005; Vercellino y col., 2005).
- 6 – Las terapias actuales frente a la EM son efectivas solo parcialmente y se asocian con efectos secundarios significativos y con una potencial toxicidad (Waubant, 2003; Fontoura y col., 2006). Sin embargo, las experiencias del doctor Nieper, en los años 60, con enfermos de EM muestran una gran mejoría en los pacientes tratados con la sal de calcio, magnesio y potasio del fosfato de etanolamina.

Por todo ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Estudio del sistema somatostatinérgico en corteza frontal, hipocampo y estriado de la rata Lewis con encefalomiелitis autoinmune experimental aguda.

Para abordar dicho objetivo, se midieron los siguientes parámetros en ratas control y ratas con EAE aguda:

1.1. Contenido de SRIF mediante:

- La determinación de los niveles de SRIF inmunorreactiva en extractos de corteza frontal, hipocampo y estriado de rata por radioinmunoanálisis.

1.2. Expresión de los receptores de SRIF mediante la medición de:

- Los parámetros de equilibrio de la unión de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF}$ a sus receptores en membranas procedentes de corteza frontal, hipocampo y estriado de rata.
- Expresión de los subtipos sst1-sst4 a nivel proteico, mediante western blot, en membranas de dichas áreas cerebrales.
- Niveles del ARNm del subtipo de receptor sst2 mediante PCR a tiempo real.
- Niveles proteicos del factor de transcripción CREB fosforilado.
- Niveles proteicos del factor de transcripción CREB fosforilado.

1.3. Funcionalidad de los receptores de SRIF mediante la medición de:

- La actividad AC basal y estimulada por FK, así como la inhibición por SRIF de dichas actividades en membranas de corteza frontal, hipocampo y estriado de rata.
- Niveles proteicos de las subunidades α_1 , α_2 y α_3 de las proteínas Gi mediante western blot en membranas de corteza frontal, hipocampo y estriado de rata.

2.- Evaluar los efectos de la sal de calcio, magnesio y potasio del fosfato de etanolamina sobre la vía de señalización de la SRIF en hipocampo y estriado de la rata con encefalomiелitis autoinmune experimental aguda.

Para ello, se determinaron los parámetros descritos anteriormente.

3.- Evaluar los efectos de la sal de calcio, magnesio y potasio del fosfato de etanolamina sobre los síntomas clínicos de la EAE aguda mediante:

- Detección de infiltrados linfocitarios en estriado de rata
- Medición de los niveles de anticuerpos autorreactivos frente a PBM en suero de rata.
- Determinación de los niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-1 β en extractos de hipocampo y estriado de rata.

Materiales y Métodos

La enfermedad hace buena y agradable la salud, el hambre a la saciedad, el trabajo al reposo.

Heráclito de Éfeso.

**I. REACTIVOS**

Ácido 2,2' - azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Ácido cítrico	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA)	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Ácido tricloroacético (TCA)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Acrilamida	(Serva, Heidelberg, Alemania)
Adenosín 5'-trifosfato (ATP)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Adenosín 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPC)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
[³ H]-Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico ([³ H]AMPC)	(Du Pont, Boston Ma, USA)
ADNasa	(Roche, Barcelona, España)
Adyuvante completo de Freund	(Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA)
Agua oxigenada (H ₂ O ₂)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Albúmina sérica bovina (BSA)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Alúmina	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Anticuerpos monoclonales anti-Giα ₁ y anti-Giα ₂	(Chemicon Int., California, USA)
Anticuerpo policlonal anti-Giα ₃	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpos policlonales anti-sst1-4	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpos monoclonales anti-GRK2, anti-GRK5 y anti-GRK6	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo monoclonal anti-CREB-P	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo 2 ^{ario} (IgG de conejo anti-cabra conjugada con peroxidasa)	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo 2 ^{ario} (IgG de conejo anti-ratón conjugada con peroxidasa)	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)



Anticuerpo 2 ^{ario} (IgG de ratón anti-conejo conjugada con peroxidasa)	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Anticuerpo 2 ^{ario} (IgG de cabra anti-rata conjugada con peroxidasa)	(Sta. Cruz Biotechnology, California, USA)
Azida sódica	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Azul de bromofenol	(Sigma, St Louis, Mo, USA)
β -mercaptoetanol	(Sigma, St Louis, Mo, USA)
Bacitracina	(Sigma, St Louis, Mo, USA)
Carbón Norit A	(Serva, Heidelberg, Alemania)
Cloramina T	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Creatín fosfato (CP)	(Sigma, St Louis, Mo, USA)
Creatín quinasa (CK)	(Sigma, St Louis, Mo, USA)
Dextrano	(Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, Reino Unido)
Dietilpirocarbonato (DEPC)	(Sigma, St Louis, Mo, USA)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Dodecil sulfato sódico (SDS)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Desoxinucleósidos trifosfato (dNTP)	(Roche, Barcelona, España)
Ensayo de PCR a tiempo real por encargo para sst2	(Applied Biosystems, Foster City, MO)
Fluoruro de fenilmetisulfonilo (PMSF)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Formamida desionizada	(Sigma, St Louis, Mo, USA)
Forskolina (FK)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Fosfato de etanolamina (PEA)	(Natur-import, Barcelona, España)
Glicina	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Glicerol	(Panreac Química, Barcelona, España)
Guanosín 5'-trifosfato (GTP)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Heparina	(Leo Pharma, Plantation, FL, USA)
3-Isobutil-1-metilxantina (IBMX)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Kit de ELISA para la detección de interleukina 1 β (IL-1 β)	(e-biosciences, San Diego, Ca, USA)



Kit de ELISA para la detección de interferón- γ (IFN γ)	(e-biosciences, San Diego, Ca, USA)
Kit de ELISA para la detección de factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	(e-biosciences, San Diego, Ca, USA)
Líquido de centelleo OptiPhase HiSafeII	(Wallac, Turku, Finlandia)
Master Mix para PCR a tiempo real	(Applied Biosystems, Foster City, MO)
Membranas de nitrocelulosa y nylon	(Pall Corporation, Florida, USA)
Metabisulfito sódico	(Merck, Darmstadt, Alemania)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA)
N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfónico (HEPES)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Na ¹²⁵ I	(Perkin-Elmer, Boston, Ma, USA)
N', N'-metilen-bisacrilamida	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Persulfato amónico	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Placas p-96 para ELISA	(Iwaki, Gyouda, Japón)
Proteína Básica de Mielina (PBM)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Inhibidor recombinante de ribonucleasas RNase OUT	(Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA)
Sacarosa	(Merck, Darmstadt, Alemania)
Sephadex G-25 fino	(Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, Reino Unido)
Somatostatina-14 (SRIF-14)	(Calbiochem, La Jolla, Ca, USA)
Talco	(Panreac Química, Barcelona, España)
Teofilina	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
Transcriptasa inversa	(Invitrogen, Carlsbad, Ca, USA)
Trietanolamina (TEA)	(Sigma, St. Louis, Mo, USA)
TriReagent	(Sigma, St Louis, Mo, USA)
Tris-hidroximetil-amino-metano (Tris)	(Merck, Darmstadt, Alemania)



Tween-20

(Panreac Química, Barcelona,
España)

Tyr¹¹-SRIF-14

(Universal Biological Ltd.,
Cambridge, Reino Unido)



II. ANIMALES Y MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN

A. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el presente trabajo se han utilizado ratas Lewis hembra, con una edad de 8 semanas, procedentes de Charles River Laboratories. Los animales se sometieron a ciclos constantes de 12 h de luz y de oscuridad, manteniéndose el estabulario a una temperatura de 22°-24°C, con ventilación continua. La alimentación que recibieron las ratas constaba de pienso granulado (dieta completa de mantenimiento para ratas UAR A04, Panlab); como bebida, se les suministró agua corriente *ad libitum*.

B. MODELOS EXPERIMENTALES

1. Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental aguda

El modelo de EAE se induce siguiendo el método de Matsumoto y col. (1990). La proteína básica de mielina (PBM) se disuelve en una emulsión de tampón fosfato salino (PBS) con adyuvante completo de Freund (1:1) suplementado con *Mycobacterium tuberculosis* (1mg/ml). Se inyectan 100 µl de esta emulsión en las almohadillas de cada una de las patas posteriores del animal. A los 10-12 días de la inducción, las ratas desarrollan los síntomas de la enfermedad, que se evalúan de acuerdo al siguiente esquema:

Grado 0: sin síntomas

Grado 1: flacidez de la cola

Grado 2: debilidad de las patas posteriores

Grado 3: parálisis de los miembros posteriores

Grado 4: muerte provocada por EAE

Con frecuencia, los grados 3 y 4 de la enfermedad se acompañan de incontinencia fecal y urinaria.

2. Tratamiento con fosfato de etanolamina

La sal de calcio, magnesio y potasio de fosfato de etanolamina (PEA) se disuelve en agua bidestilada con un pH ligeramente ácido. Esta solución se administra por la mañana (11:00-12:00) a un grupo de ratas Lewis hembra (8 semanas de edad) a una dosis



de 150, 300 ó 600 mg/kg peso/día en un volumen fijo de 1 ml por vía intraperitoneal (i.p.). Los animales control reciben el mismo volumen de vehículo.

Se han elegido dos tiempos de administración con objeto de valorar si existe una prevención o una remisión de los síntomas provocados por la EAE. A un grupo de ratas se les administra el fármaco PEA desde los dos días anteriores a la inducción de la EAE aguda hasta el sacrificio del animal. En un segundo grupo, se administra a las ratas el PEA desde la aparición de los primeros síntomas hasta la total desaparición de los mismos, siempre y cuando no se haya producido la remisión de los síntomas en el grupo de ratas enfermas con EAE.

III. EXTRACCIÓN Y DISECCIÓN DEL CEREBRO

A. EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO

Los animales se sacrifican por decapitación con la guillotina, a nivel de la primera y segunda vértebra cervical. Inmediatamente después del sacrificio, se procede a la extracción del encéfalo. Se efectúa una incisión longitudinal de la piel de la cabeza, de nuca a hocico, y una vez retirada la piel, se disecan los músculos dorsales de la nuca. Se introduce la punta de unas tijeras finas en los márgenes laterales del agujero occipital, de forma laterodorsal al bulbo raquídeo, y en dirección oblicua hacia el conducto auditivo externo. Con unas pinzas, se separa el hueso occipital, haciendo presión hacia fuera y, del mismo modo, se levantan los huesos parietales, haciendo tracción hacia arriba. Normalmente, al separar los huesos parietales se desprende la duramadre, dejando accesible el cerebro; de no ser así, se corta longitudinalmente en dirección al espacio interhemisférico y se separa posteriormente hacia los lados con unas pinzas finas. A veces, es necesario ampliar la craneotomía mediante sección y eliminación de fragmentos de los huesos frontales para obtener el encéfalo en su totalidad.

Una vez aislada la porción dorsal del cerebro, se seccionan los nervios olfatorios con una espátula roma, que se pasa por debajo y por delante de la sutura frontoparietal. Posteriormente, se seccionan los fascículos ópticos, las arterias carótidas, el tallo hipofisario y los nervios craneales que salen a uno y otro lado del tronco cerebral, quedando libre el encéfalo, el cual se extrae y se deposita sobre una placa de metal enfriada en hielo.



B. DISECCIÓN DEL CEREBRO

Una vez extraído el cerebro, se procede a la disección de la corteza frontal, el hipocampo y el estriado por el método de Glowinski e Iversen (1966).

El cerebro se deja reposar sobre su parte convexa y se separa el rombencéfalo (A)

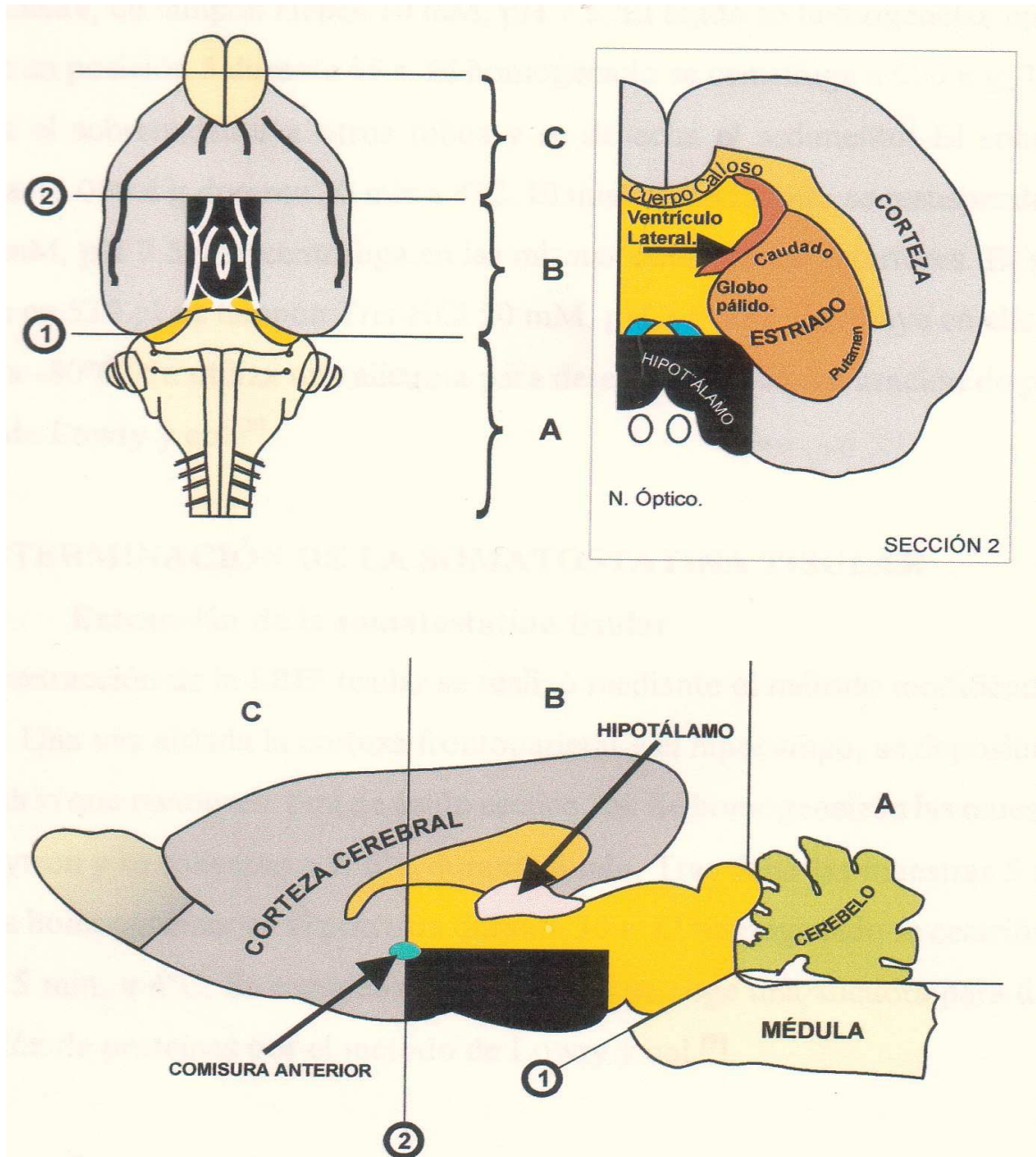


Figura 9: Representación esquemática de la disección del cerebro.

del resto del cerebro mediante una sección transversal (figura 9, sección 1), descartándolo. A continuación, se realiza una sección transversal a nivel del quiasma



óptico que pasa a través de la comisura anterior (sección 2), el cual delimita la parte anterior del hipotálamo. Esta sección separa el cerebro en dos partes: B y C.

La corteza se obtiene del lóbulo frontal de la parte C, eliminando la sustancia blanca adherida. Para aislar el hipocampo, se separa el cerebro medio, quedando así dicha estructura al descubierto. En el caso del estriado, se introduce un sacabocados en ambos hemisferios de las partes correspondientes de los fragmentos B y C.

IV. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LA INFLAMACIÓN PRESENTE EN TEJIDO CEREBRAL DE RATA

A. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se extrae el encéfalo tal y como se ha descrito en el apartado III. A continuación, se divide el cerebro en cerebro anterior y cerebro posterior y se fija en formaldehído al 5% durante una noche. Tras la fijación, el tejido es deshidratado e incluido en parafina para su posterior tratamiento.

B. MÉTODO

El examen histológico se lleva a cabo en los cerebros de los animales de experimentación mediante tinción con hematoxilina-eosina, para evaluar la presencia de infiltrados inflamatorios. Para ello, se cortan las muestras con un microtomo a un grosor de 5 μm , se tiñen con hematoxilina de Harris durante 5 min y se lavan posteriormente con agua corriente. Tras la primera tinción, se realiza un paso de diferenciación con alcohol-ácido y un nuevo lavado con agua corriente. A continuación, se someten las muestras a una inmersión en agua amoniacal y después, se lavan las muestras durante 10-20 min en agua y se tiñen con eosina durante 5 min. El exceso de eosina se lava con alcohol al 95%.

V. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS CELULARES

El aislamiento de las membranas cerebrales se lleva a cabo según el método descrito por Reubi y col. (1981). La corteza frontal, el hipocampo y el estriado se suspenden en 6, 3 y 3 ml, respectivamente, de tampón HEPES 10 mM, pH 7,6. El tejido se homogeniza en un polytron Brinkmann en posición 5 durante 15 s. El homogenado se



centrifuga a 600 x g, 10 min a 4° C. Se decanta el sobrenadante a tubos limpios y se desecha el sedimento. El sobrenadante se centrifuga a 48 000 x g durante 30 min a 4° C. El nuevo sedimento se resuspende en 10 ml de HEPES 10 mM, pH 7,6 y se centrifuga en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Finalmente, el sedimento se resuspende en 530 µl de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y se distribuye en alícuotas que se conservan a -80°C. Se utiliza una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

VI. MARCAJE DE TYR¹¹-SOMATOSTATINA-14 CON ¹²⁵INa

El marcaje de la Tyr¹¹-SRIF-14 se realiza según el método descrito por Greenwood y col. (1963). Posterior a la reacción del marcaje, se purifica la mezcla de reacción por cromatografía de exclusión molecular para separar el trazador del resto de las impurezas que le acompañan. Dicha purificación se realiza en una columna de Sephadex G-25 fino equilibrado con ácido acético 0,1 M/BSA 0,1%.

A. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Tyr¹¹-SRIF-14

Se disuelven 0,5 mg de Tyr¹¹-SRIF-14 en 0,5 ml de ácido acético 0,1 M. A 100 µl de la solución del péptido, se le añaden 300 µl de un tampón acetato sódico 0,1 M a pH 7,4. Se utilizarán 10 µl de dicha solución para el marcaje.

2. Cloramina T (C₇H₇CINNaO₂.S.H₂O)

La Cloramina T (10 mg) se disuelve en 5 ml de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5. Se prepara dicha solución 10 min antes del marcaje y se deja en oscuridad hasta su uso. Se emplea la cloramina T como un oxidante débil.

3. Metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅)

El metabisulfito sódico se prepara disolviendo 20 mg de dicho compuesto en 5 ml de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5. El metabisulfito se emplea como reductor para detener la reacción de oxidación desencadenada por la cloramina T.

4. Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 con 0,25% de BSA

Se disuelven 1,15 g de Na₂HPO₄ y 0,296 g de NaH₂PO₄ en 100 ml de agua bidestilada y se ajusta el pH a 7,4. Después, se separan 50 ml a los que se añaden 0,125 g de BSA.



5. Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 con 5% talco

Se toman los 50 ml del tampón fosfato sódico 0,1 M sobrante y se le añaden 2,5 g de talco.

B. PREPARACIÓN DE LA COLUMNA DE CROMATOGRAFÍA

Se añaden 10 g de Sephadex G-25 (fino) a 50 ml de agua destilada y desionizada, hirviendo la mezcla al baño maría durante 1 h. Después, se deja reposar la mezcla para eliminar, posteriormente, el agua. A este Sephadex, se le añaden 50 ml de ácido acético 0,1 M que contiene BSA al 0,1% y se deposita la mezcla en una columna de vidrio de 1x45 cm, hasta conseguir una altura aproximada de 40 cm. Una vez empaquetada la columna, se equilibra con 50 ml de ácido acético 0,1 M con BSA al 0,1%.

C. MARCAJE

La reacción de marcaje tiene lugar a temperatura ambiente, en un tubo de microfuga en el que se habrán añadido previamente 10 µl de Tyr¹¹-SRIF-14 (2,5 µg). A este tubo se le añaden 40 µl de tampón fosfato potásico 0,3 M, pH 7,5. A continuación, se retiran 10 µl para que la cantidad de Tyr¹¹-SRIF-14 que quede para el marcaje sea de 2,5 µg. Posteriormente, se adiciona 1 mCi de ¹²⁵I Na y 5 µl de la disolución de cloramina T, agitando la mezcla durante 30 s. Finalmente, se agregan 5 µl de la disolución de metabisulfito sódico y 200 µl de ácido acético 0,1 M con BSA 0,1%. Se toma una alícuota de 1 µl de la mezcla de marcaje y se pasa a un tubo que contiene 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4 con BSA 0,25% para determinar el porcentaje de incorporación de ¹²⁵I al péptido mediante el test de adsorción al talco.

D. PURIFICACIÓN

Se deja que el volumen de líquido que se encuentra por encima del Sephadex G-25 penetre en el lecho cromatográfico y se añade la mezcla de reacción, esperando a que penetre en el gel. La elución se realiza con ácido acético 0,1 M que contiene BSA al 0,1%, recogiendo alícuotas de 1 ml en el colector de fracciones. Se toman alícuotas de 10 µl de cada tubo para contar la radioactividad (figura 10). Finalmente, se mezclan todos los tubos que dieron mayor incorporación de ¹²⁵I y se reparte el volumen resultante en alícuotas de 0,2 ml, que se conservan a -20°C.

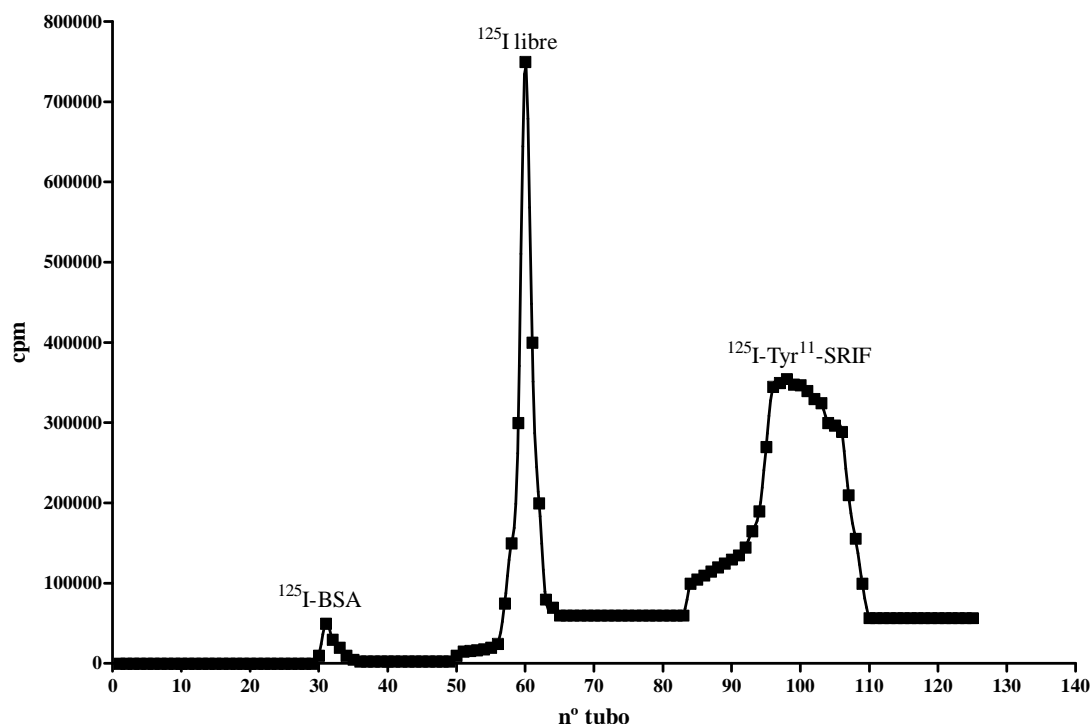


Figura 10: Purificación de la SRIF-14 marcada con ¹²⁵I en una columna de Sephadex G-25.

E. TEST DE ADSORCIÓN A TALCO

A 1 µl de la mezcla de reacción, cuya radioactividad se ha medido previamente, se le añade 1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4, que contiene BSA al 0,25%, y 1 ml de suspensión de talco 5% en tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4. Se centrifuga el tubo 10 min a 750 x g, se aspira el sobrenadante y se mide la radiación emitida por los sedimentos que quedan tras la centrifugación.

Conociendo la radioactividad total en cuentas por minuto (c.p.m. total) de la muestra anterior al test y la radioactividad del sedimento (c.p.m. sedimento), el porcentaje de incorporación (% I) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{\text{cpm sedimento}}{\text{cpm total}} \times 100$$



VII. ENSAYO DE UNIÓN DE LA SOMATOSTATINA A SUS RECEPTORES EN MEMBRANAS DE CORTEZA FRONTAL, HIPOCAMPO Y ESTRIADO

La unión específica de la SRIF se determina mediante un método modificado de Czernik y Petrack (1983).

A. REACTIVOS

1. **Ácido acético 0,1 M con BSA 0,1%**

2. **Tampón de incubación (pH 7,5):**

Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂·6H₂O 5mM, BSA 0,2% y bacitracina 0,1 mg/ml.

3. **Somatostatina fría**

A partir de una alícuota de SRIF-14 (6,1 x 10⁻⁴ M) disuelta en ácido acético 0,1 M con BSA 0,1%, se prepara una curva de SRIF en tampón de incubación a concentraciones finales de 10⁻¹¹ M hasta 10⁻⁷ M. Esta última concentración se utiliza para estudiar la unión inespecífica.

4. **¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14**

Se diluye una alícuota de ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF en tampón de incubación hasta una concentración final de 250 pM.

5. **Membranas cerebrales**

Las membranas obtenidas por el método descrito anteriormente (apartado IV) se resuspenden en tampón de incubación a una concentración final de proteínas de 0,15 mg/ml.

B. MÉTODO

Se realizan las incubaciones en tubos Beckman en un volumen final de 250 µl. Los reactivos se añaden en el siguiente orden y volumen:

* 175 µl de tampón de incubación

* 25 µl de SRIF fría (10⁻¹¹ M-10⁻⁷ M). Los tubos con concentración “cero” llevan 25 µl de tampón de incubación

* 25 µl de ¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14 (250 pM) en tampón de incubación.

La reacción se inicia añadiendo 25 µl de la correspondiente preparación de membranas. Los tubos se incuban 60 min en un baño a 30°C sin agitación. Al cabo de



este período, las muestras se centrifugan en una microfuga a 13 000 rpm durante 2 min. Se aspira el sobrenadante y se lava el pellet con Tris/sacarosa (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 y sacarosa 9%), determinándose las c.p.m. en un contador γ (Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS) con una eficacia de contaje para el ^{125}I del 86%.

Se preparan en paralelo tubos que contienen únicamente 25 μl de ^{125}I -Tyr¹¹-SRIF-14, que representan la actividad total. Los resultados se expresan como porcentaje de ^{125}I -Tyr¹¹-SRIF-14 unido específicamente respecto a la actividad total. La unión específica (%B específico) se calcula restándole a la unión total la unión inespecífica:

$$\% \text{ B específico} = \% \text{ B total} - \% \text{ B inespecífico.}$$

VIII. INMUNODETECCIÓN DE LOS SUBTIPOS DE RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

A. REACTIVOS

1. TTBS (pH 7,5):

Tris-HCl 50 mM
NaCl 150 mM
Tween-20 0,05%

2. Acrilamida/Bisacrilamida 30%

Se añaden 29,2 g de acrilamida y 0,8 g de N'N'-metilen-bisacrilamida a 25 ml de agua bidestilada y se calienta la mezcla a 50°C en agitación. Una vez disueltos, se enrasa a un volumen total de 100 ml y se almacena la mezcla a 4°C.

3. Tampón de muestras (pH 6,8):

Tris-HCl 60 mM
SDS 3%
Glicerol 10%
Azul de bromofenol 0,003%
 β -mercaptoetanol 1%.

4. Tampón de electroforesis (pH 8,5):

Tris-HCl 50 mM
Glicina 384 mM
SDS 0,1%



5. Tampón de transferencia (pH 8,3):

Tris-HCl 25 mM

Glicina 192 mM

Metanol 20%

SDS 0,05%

6. Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

7. Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

B. MÉTODO

1. Preparación de los geles

*Gel separador (12%):

Tris-HCl 1,5 mM, pH 8,8

SDS 10%

Acrilamida/bisacrilamida 30%

Persulfato amónico 0,1 g/ml

TEMED

Agua

*Gel concentrador (5%)

Tris-HCl 0,5 mM, pH 6,8

SDS 10%

Acrilamida/bisacrilamida 30%

Persulfato amónico 0,1 g/ml

TEMED

Agua

2. Preparación de las muestras

Se toma un volumen determinado de las muestras y se centrifuga durante 5 min a velocidad máxima en una minifuga. A continuación, se aspira el sobrenadante y el sedimento se resuspende en tampón de muestras de modo que la cantidad de proteínas a cargar en el gel sea de 100 µg. Previo a la carga de las muestras en el gel, éstas se calientan a 100° C durante 5 min, con el fin de desnaturalizar las proteínas.



3. Electroforesis

La electroforesis se lleva a cabo a 100 V en el tampón de electroforesis.

4. Transferencia

Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico de 15 V durante toda la noche en tampón de transferencia.

5. Inmunoblot

Las membranas de nitrocelulosa se bloquean con TTBS/leche 5% durante 90 min en agitación a 4° C. Una vez bloqueada la membrana, ésta se incuba con los anticuerpos policlonales anti-sst1-4 diluidos 1:1000, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario y se lavan las membranas una vez con TTBS/leche 5% y dos veces más con TTBS durante 5 min. Posteriormente, se añade el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido 1:2000, y las membranas se incuban a 4°C durante 1 h. Finalmente, se retira el anticuerpo secundario y se realizan seis lavados con TTBS para eliminar completamente los restos de anticuerpo no unido. El revelado de los inmunoblots se lleva a cabo por quimioluminiscencia, utilizando un sistema de detección de quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnologies.

IX. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm DEL RECEPTOR DE SOMATOSTATINA sst2

A. REACTIVOS

- 1. Agua dietilpirocarbonato (DEPC) 0,005%**
- 2. Tri-Reagent**
- 3. Cloroformo**
- 4. Etanol 75%**
- 5. Tampón de enzima 10X (pH 7,6)**
 - Trizma-base 500mM.....0,303 g
 - MgCl₂ 500mM.....0,508 g
- 6. ADNasa I**



7. **Tampón de parada (pH 8,0)**
 - EDTA 500 mM.....1,86 g
 - SDS 2%.....0,4 g
8. **Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 1:1:0,02**
9. **Etanol absoluto**
10. **Acetato sódico 3M**
11. **Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer 0,5 mg/ml**
12. **dNTPs 10mM**
13. **DTT 0,1 M**
14. **Inhibidor recombinante de ribonucleasas RNase Out**
15. **M-MLV RT 2000 uds/μl**
16. **TaqMan Universal PCR MasterMix sin amperasa**
17. **Assay on demand**

B. MÉTODO

1. Extracción de ARN

El ARN total se extrae de 50 mg de hipocampo o estriado mediante el método de la guanidina isotiocianato, utilizando un kit comercial (Tri-Reagent). Las muestras se homogenizan en un homogenizador Potter en 0,5 ml de Tri-Reagent y se centrifugan a 12 000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfieren a tubos nuevos y se incuban durante 5 min a temperatura ambiente, para que los complejos de nucleoproteínas puedan deshacerse. Posteriormente, se añaden 200 μl de cloroformo por cada ml de Tri-Reagent utilizado en la extracción, se agitan fuertemente las muestras durante 15 s, se mantienen 5 min a temperatura ambiente y se centrifugan de nuevo a 12 000 x g durante 15 min a 4°C. Se recoge la fase acuosa y se transfiere a tubos limpios y estériles. Se añaden 0,25 ml de isopropanol para precipitar el ARN presente en la fase acuosa y se deja reposar la mezcla 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugan a 12 000 x g durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes se desechan y se lavan los precipitados con 1 ml de etanol 75%. Después, las muestras se centrifugan de nuevo a 7 500 x g durante 5 min a 4°C. Finalmente, los precipitados se secan a temperatura ambiente y se resuspenden en 50 μl de H₂O-DEPC. Después, se determina la



concentración y el grado de pureza de la mezcla de ácidos nucleicos obtenida. Para determinar el grado de pureza del ARN, se toman 3 µl de los 50 µl y se realiza una dilución 1:200 en H₂O-DEPC. Se mide la absorbancia de la muestra a 260 nm y a 280 nm usando H₂O-DEPC como blanco y se calcula la pureza utilizando la siguiente fórmula:

$$Pureza = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Si la relación se encuentra entre 1,8 y 2, se considera que la muestra tiene un grado de pureza aceptable. Para calcular la concentración de ARN, se considera que una unidad de absorbancia (D. O.) a 260 nm corresponde a 40 µg/µl de ARN.

2. Digestión con ADNasa y precipitación del ARN

Se toman 20 µg de ácidos nucleicos de cada una de las muestras obtenidas en el paso anterior y se mezclan con 10 µl de tampón 10x, 10 µl de ADNasa I y se enrasa hasta 100 µl con H₂O-DEPC. Se incuban 30 min a 37°C, tras lo cual se añaden 10 µl de tampón de parada, y se incuban durante 10 min adicionales a 37°C. La reacción se detiene en hielo. A cada muestra se le añadirá un volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:isoamílico y, tras agitar las muestras durante 30 s, se centrifugan durante 15 min a velocidad máxima a 4°C. Se recoge la fase acuosa en tubos nuevos y se añade 1/10 de volumen de acetato sódico y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se llevan a -20°C durante toda la noche y se centrifugan a 12 000 x g durante 15 min a 4°C. Se retira el sobrenadante, se añade 1 ml de etanol 75% y se centrifuga a 12 000 x g durante 15 min a 4°C. Este paso se repite una vez más y después, se retira el sobrenadante y se deja secar a temperatura ambiente. Una vez se ha secado por completo, se añaden 45 µl de H₂O-DEPC. Se toman 5 µl y se mide la pureza y la concentración del ARN del mismo modo descrito en el apartado B.1.

3. Transcripción inversa y PCR a tiempo real

La reacción de transcripción inversa se lleva a cabo con 50 ng de ARN total, utilizando para ello el archivo de ADNc (Applied Biosystems), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La PCR a tiempo real se realiza en un termociclador Rotor Gene 3000 de Corbett Research, utilizando el MasterMix Taqman (Applied Biosystems) con los parámetros recomendados por el fabricante. Las PCRs se realizan por duplicado en un volumen total



de 20 μl con 0,5-1 μl de los productos resultantes de la reacción de la transcripción inversa. Se emplea un ensayo de expresión génica Taqman específico para el subtipo sst2. Dicho ensayo lleva como marcador la 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' del elemento de unión al surco menor (MGB) de la sonda y un “quencher” en el extremo 3' de la sonda. Se utiliza un gen de expresión constitutiva (β -actina) como control endógeno, con el objeto de normalizar los resultados.

Para la cuantificación relativa de la expresión, se utiliza el método de la $\Delta\Delta C_T$, como recomienda el fabricante. Los datos se expresan como valores de C_T (el número de ciclo en el que las curvas de amplificación cruzan un umbral calculado) y se utilizan para calcular los valores de ΔC_T ($\Delta C_T = C_T$ del gen de interés – C_T del gen empleado como control endógeno). Este valor se calcula para cada muestra. La muestra control se utiliza como referencia para cada comparación. El último paso es la transformación de estos valores en valores absolutos. La fórmula para cambios en la expresión génica es: $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Los análisis estadísticos se realizan con los valores de ΔC_T

X. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA

El estudio de la actividad AC se lleva a cabo de acuerdo con el método de Houslay y col. (1976), con pequeñas modificaciones.

La medida de la actividad AC se realiza cuantificando el AMPc producido mediante el método de la proteína enlazante. Dicho método consiste en establecer una competición entre el AMPc producido y el AMPc añadido al medio, que compiten por unirse a las subunidades reguladoras de la PKA.

A. REACTIVOS

- 1. Trietanolamina (TEA) 25 mM, pH 7,4**
- 2. TEA 25 mM, pH 7,4/BSA 0,1%**
- 3. Reactivo 1**

Contiene EDTA 6 mM y MgSO_4 30 mM disueltos en TEA 25 mM, pH 7,4



4. Reactivo 2

Se prepara disolviendo 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 6 mM, bacitracina 6 mg/ml y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,6 mM en TEA 25 mM, pH 7,4

5. Creatin fosfato (CP)

La CP se utiliza a una concentración de 90 mg/ml en TEA 25 mM, pH 7,4

6. Creatin quinasa (CK)

La CK se prepara a una concentración de 12 mg/ml en TEA 25 mM, pH 7,4

7. Guanosín 5'-trifosfato (GTP)

Se prepara el GTP a una concentración de 10 μ M en TEA 25 mM, pH 7,4

8. Adenosín 5'-trifosfato (ATP)

Se prepara el ATP a una concentración de 15 mM en TEA 25 mM, pH 7,4

9. Cóctel

El cóctel contiene los siguientes reactivos:

- *1 volumen de reactivo 1
- *1 volumen de reactivo 2
- *0,5 volúmenes de CP
- *0,5 volúmenes de CK
- *0,006 volúmenes de GTP

10. Medio de la curva

El medio de la curva contiene:

- *1 volumen de reactivo 1
- *1 volumen de reactivo 2
- *1,6 volúmenes de TEA 25 mM, pH 7,4
- *0,4 volúmenes de ATP 1,5 mM

11. Medio de dilución

El medio de dilución contiene:

- *1 volumen de reactivo 1
- *1 volumen de reactivo 2
- *2 volúmenes de TEA 25 mM, pH 7,4

12. Alúmina

Se prepara la suspensión de alúmina a una concentración de 0,75 mg/ml en TEA 25 mM, pH 7,4



13. Solución PK

La solución PK contiene:

*100 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5

*2 g de BSA

*0,186 g de EDTA

*0,0144 g de teofilina

*41 µl de β-mercaptoetanol

14. Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico (AMPC)

Se parte de una preparación monohidratada de AMPC y se disuelve en tampón fosfato 0,2 M, pH 6,5 a una concentración de 1 nmol/ml.

15. Somatostatina-14 (SRIF-14)

Se utiliza la SRIF-14 como inhibidor de la actividad AC a una concentración final de 10^{-4} M, diluida en TEA 25 mM, pH 7,4 que contiene 0,1 % de BSA.

16. Forskolina (FK)

A partir de una alícuota de FK 10^{-2} M disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO), se preparan diluciones progresivas con TEA 25 mM pH 7,4, con objeto de alcanzar una concentración final de 10^{-5} M.

17. [³H]-AMPC

Se diluye una preparación comercial de [³H]-AMPC (sal amónica en solución de etanol 50:50) en tampón fosfato 0,05 M, pH 6,5 para obtener una concentración final de 0,1 M. Se diluye esta solución de [³H]-AMPC 1/16 en tampón fosfato 0,05 M, pH 6,5.

18. Suspensión de carbón activo

Con objeto de separar el [³H]AMPC que no se ha unido a la PKA de lo unido, se prepara una suspensión de carbón activo 2,6% (p/v) y BSA 2% en tampón fosfato 0,05 M pH 6,5.

B. CURVA ESTÁNDAR DE AMPC

Para construir la curva patrón, el AMPC frío se diluye con el medio de la curva (Figura 11). El rango de concentraciones de AMPC utilizado oscila entre 5 y 300 pmol/ml (eje de abscisas). En ordenadas se representa el porcentaje de [³H]-AMPC unido a la PKA con respecto a la radioactividad total.



C. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA A

La obtención de la PKA se realizó según el protocolo descrito por Gilman (1970). La PKA se extrae de músculo de conejo. Los músculos de las extremidades y del dorso del conejo se trocean con tijeras y se homogeniza el tejido en 2,5 volúmenes de EDTA 4 mM, pH 7, en un homogeneizador de aspas (Omni-Mixer de Dupont Instruments) a velocidad máxima durante 2 min en hielo. El homogeneizado se filtra a través de una gasa doble y el filtrado se centrifuga a 8 000 x g durante 15 min a 4° C. Se desecha el sedimento y el sobrenadante se centrifuga 30 min a 10 000 x g a 4° C. Se desecha el sedimento resultante y el sobrenadante se ajusta a pH 6,1 con ácido acético 1 N. Se deja reposar la solución 1 h en hielo para que se produzca la precipitación; el precipitado corresponde a la fosforilasa quinasa y a la glucógeno sintetasa. Posteriormente, se centrifuga la mezcla a 10 000 x g durante 30 min a 4° C; se vuelve a desechar el precipitado y el sobrenadante se ajusta a pH 5,5 con ácido acético 1 N y se deja reposar en hielo 1 h. Se vuelve a centrifugar la mezcla a 10 000 x g durante 30 min a 4° C y tras desechar el precipitado, el sobrenadante se ajusta a pH 6,8 con tampón fosfato potásico 1 M, pH 7,2. A continuación, se añade lentamente (NH₄)₂SO₄ sólido (32,5 g por cada 100 ml de sobrenadante) para precipitar proteínas. Se mantiene la mezcla en agitación 2 h, se centrifuga a 10 000 x g durante 1 h a 4° C y el precipitado se resuspende en 50 ml de Tris-HCl 5 mM, pH 7,5. La solución se coloca en una membrana de celulosa cerrada por los extremos superior e inferior y se dializa durante 48 h a 4°C en 20 volúmenes del mismo tampón, cambiando el tampón cada 12 h. A las 48 h, el dializado se centrifuga a 10 000 x g durante 30 min a 4°C y se recoge el sobrenadante, que contiene la PKA; se preparan alícuotas de 200 µl de PKA y se conservan a -20 °C.

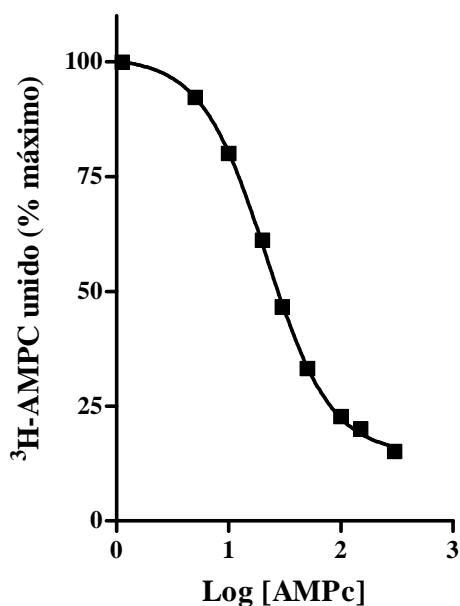


Figura 11. Curva estándar para la valoración de la producción de AMPc, por el método de la proteína enlazante.

D. TITULACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA A

Previo a su uso, es necesario realizar una titulación de la PKA obtenida. Para ello, se preparan varias diluciones (1/10, 1/15, 1/20, 1/30, 1/40 y 1/50) y se valora su capacidad de unión al [³H]AMPC en presencia de cantidades crecientes de AMPc frío (5, 10, 20, 30, 50, 100, 150 y 300 pmol). En el caso de los resultados mostrados en la Figura 12, se eligió la dilución 1/40 por presentar una sensibilidad adecuada para la valoración del AMPc.

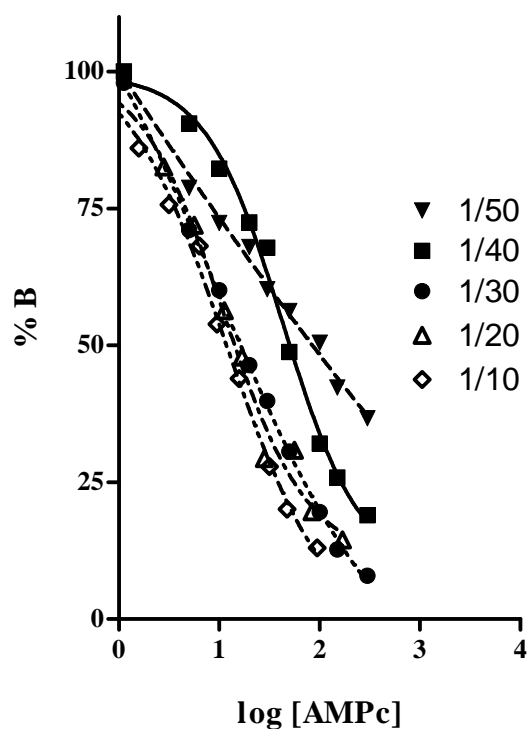


Figura 12 Curvas de desplazamiento de la unión de $[^3\text{H}]$ -AMPc a la PKA a diferentes diluciones de la misma.

E. MÉTODO

Todas las pruebas se realizan por duplicado. Las membranas de hipocampo, estriado o corteza frontal se incuban en un volumen final de 100 μl que contiene:

TUBO	10 μl	10 μl	50 μl
1,2 Actividad basal	TEA 25 mM	TEA 25 mM + 0,1% BSA	CÓCTEL
3,4 Inhibición de la actividad basal	TEA 25 mM	SRIF 10^{-4} M	CÓCTEL
5,6 Actividad estimulada	FK 10^{-5} M	TEA 25 mM + 0,1% BSA	CÓCTEL
7,8 Inhibición de la actividad estimulada	FK 10^{-5} M	SRIF 10^{-4} M	CÓCTEL

Se añaden a cada tubo 20 μl de las membranas procedentes de hipocampo, estriado o corteza frontal a una concentración final de 0,03 mg/ml suspendidas en TEA 25 mM, pH 7,4. La reacción se inicia añadiendo 10 μl de ATP 1,5 mM a los tubos previamente atemperados (4-5 min) y se incuban 15 min a 30°C en un baño con agitación.



La reacción se detiene por desnaturalización de las proteínas a 90°C durante 3 min. Se dejan enfriar los tubos y se añaden 200 µl de la suspensión de alúmina. Posteriormente, se centrifugan los tubos a 2060 x g durante 10 min a 4°C. Es necesario hacer diluciones de los sobrenadantes de las muestras (con el medio de dilución) para poder interpolar los valores con fiabilidad en la curva estándar. Las diluciones recomendadas, para nuestro lote de PKA, fueron las siguientes:

*Actividad basal e inhibición de la actividad basal: dilución 1/3.

*Actividad estimulada e inhibición de la actividad estimulada: dilución 1/15.

Se toman 50 µl de los sobrenadantes de la curva estándar y 50 µl de las diluciones anteriores. Se añaden 50 µl de la PKA diluida y se incuban los tubos durante 90 min a 4°C para conseguir la unión del AMPc a la PKA. Posteriormente, se adicionan a los tubos 50 µl de [³H]-AMPc 0,00625 M y se incuban a 4°C durante 2 h. A continuación, se añaden 150 µl de la suspensión de carbón activo (excepto a los dos tubos de actividad total) y se mantienen los tubos a 4°C durante 10-15 min. Se centrifugan los tubos a 2060 x g durante 10 min a 4°C. Se recogen 200 µl del sobrenadante resultante y se añaden a tubos que contienen 2 ml de líquido de centelleo, contándose la radioactividad presente en cada tubo en un contador β (Wallac Pharmacia 1410).

XI. INMUNODETECCIÓN DE LA SUBUNIDAD α_i DE LAS PROTEÍNAS G

A. REACTIVOS

Se preparan según lo descrito en el apartado VIII.A

B. MÉTODO

Se siguen los mismos pasos descritos en el apartado VIII.B hasta el inmunoblot.

1. Inmunoblot

Las membranas se bloquean con TTBS/leche 5% durante 90 min con agitación a 4°C. Una vez bloqueados los sitios de unión inespecífica de la membrana, ésta se incuba con el anticuerpo monoclonal anti-Gi α_1 , diluido 1:2000, o anti-Gi α_2 , diluido 1:1000, o con el anticuerpo policlonal anti-Gi α_3 , diluido 1:1000, durante toda la noche a 4°C. Al día



siguiente, se retira el anticuerpo primario y las membranas se lavan una vez con TTBS/leche 5% y dos veces más con TTBS durante 5 min. Posteriormente, se añade el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido 1:2000, y las membranas se incuban a 4°C durante 1 h. Finalmente, se retira el anticuerpo secundario y se realizan seis lavados con TTBS para eliminar completamente los restos de anticuerpo no unido. El revelado de los inmunoblots se lleva a cabo por quimioluminiscencia, utilizando un sistema de detección de quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnologies.

XII. INMUNODETECCIÓN DE LAS QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G (GRK)

A. REACTIVOS

Se preparan según lo descrito en el apartado VIII.A

B. MÉTODO

Se siguen los mismos pasos descritos en el apartado VIII.B hasta el inmunoblot.

1. Inmunoblot

Las membranas se bloquean con TTBS/leche 5% durante 90 min con agitación a 4°C. Una vez bloqueada la membrana, ésta se incuba con los anticuerpos policlonales anti-GRK5 o anti-GRK6 o con el anticuerpo monoclonal anti-GRK2, diluidos 1:1000, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario y las membranas se lavan una vez con TTBS/leche 5% y dos veces más con TTBS durante 5 min. Posteriormente, se añade el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido 1:2000, y las membranas se incuban a 4°C durante 1 h. Finalmente, se retira el anticuerpo secundario y se realizan seis lavados con TTBS para eliminar completamente los restos de anticuerpo no unido. El revelado de los inmunoblots se lleva a cabo por quimioluminiscencia, utilizando un sistema de detección de quimioluminiscencia de Santa Cruz Biotechnologies.



XIII. INMUNODETECCIÓN DE p-CREB

A. REACTIVOS

1. Para la obtención de muestras

*PBS (pH 7,4)

- Na_2HPO_4 100 mM
- NaH_2PO_4 100 mM
- NaCl 150 mM
- EDTA 1 mM
- PMSF 1 mM
- Triton X-100 1%

2. Para el inmunoblot

Se preparan los reactivos según lo descrito en el apartado VIII.A

B. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se extrae el encéfalo y se diseccionan las áreas cerebrales deseadas siguiendo los pasos ya descritos en el apartado III. A continuación, las áreas seleccionadas se colocan en 1 ml de PBS pH 7,4 y se homogenizan mediante ultrasonificación. Después, las muestras se incuban durante 1 h a 4°C. Tras la incubación, los extractos tisulares obtenidos se centrifugan durante 15 min a 12 000 x g a 4°C. Se recoge el sobrenadante, se alícuota y se guarda a una temperatura de -20° C. Se utiliza una alícuota para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Lowry y col. (1951).

C. MÉTODO

Se siguen los mismos pasos descritos en el apartado VIII.B hasta el inmunoblot.

1. Inmunoblot

Las membranas se bloquean con TTBS/leche 5% durante 90 min con agitación a 4°C. Una vez bloqueada la membrana, ésta se incuba con el anticuerpo policlonal anti-p-CREB, diluido 1:1000, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retira el anticuerpo primario y las membranas se lavan una vez con TTBS/leche 5% y dos veces más con TTBS durante 5 min. Posteriormente, se añade el anticuerpo secundario



conjugado con peroxidasa, diluido 1:2000, y las membranas se incuban a 4°C durante 1 h. Finalmente, se retira el anticuerpo secundario y se realizan seis lavados con TTBS para eliminar completamente los restos de anticuerpo no unido. El revelado de los inmunoblots se lleva a cabo por quimioluminiscencia, utilizando un kit de Santa Cruz Biotechnologies.

XIV. DETERMINACIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR

A. EXTRACCIÓN DE LA SOMATOSTATINA TISULAR

La extracción de la SRIF tisular se realiza mediante el método modificado de Patel y Reichlin (1978). Una vez aislada la corteza frontal, el hipocampo y el estriado, se deposita el tejido en tubos de vidrio que contienen 1 ml de ácido acético 2N. Se homogenizan las muestras durante 30 s en un polytron y se calientan a 100° C durante 5 min. Tras dejar enfriar las muestras 5 min en hielo, se vuelven a homogeneizar en el polytron durante 30 s. El homogenado se centrifuga a 15 000 x g durante 5 min, a 4° C. Se recolecta el sobrenadante y se alícuota, guardando las muestras a -20 °C. Se utiliza una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry y col. (1951).

B. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SOMATOSTATINA TISULAR

1. Reactivos

- a. **Tampón RIA**
- b. **Tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,2**
- c. **EDTA 10 mM**
- d. **BSA 0,3%**
- e. **SRIF-14**
- f. **¹²⁵I-Tyr¹¹-SRIF-14**



2. Método

La concentración de SRIF en los extractos tisulares se determina por radioinmunoanálisis (RIA) siguiendo un método modificado de Patel y Reichlin (1978). Dicha determinación se realiza en tubos de vidrio de borosilicato que contienen:

- 100 µl de extracto tisular (convenientemente diluido) ó 100 µl de SRIF a una concentración de 0 a 1000 fmol/tubo (curva patrón), todo ello diluido en tampón RIA
- 400 µl de tampón RIA
- 100 µl de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ diluida en tampón RIA (aproximadamente 6000 cpm/tubo)
- 200 µl de anticuerpo anti-SRIF

Además, se preparan cuatro tubos de actividad total que sólo contienen 100 µl de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$, dos tubos para calcular la unión inespecífica, que llevan 700 µl de tampón RIA y 100 µl del péptido marcado, y dos tubos para el inespecífico de las muestras, que contienen 600 µl de tampón RIA, 100 µl del extracto tisular de SRIF y 100 µl del péptido marcado. Todos los tubos se incuban a 4°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se añade a todos los tubos, excepto a los de actividad total, 1 ml de carbón activo (2%)/dextrano (0,2%). Se dejan reposar los tubos en hielo durante 15 min y después, se centrifugan a 2 000 x g durante 10 min para separar la fracción de SRIF unida de la fracción no unida al anticuerpo. Finalmente, se aspira el sobrenadante y se mide la radioactividad en el sedimento en un contador de radioactividad γ (Wallac Pharmacia 1282 Compugamma CS).

XV. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA EN SUERO DE RATA

A. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Tras el sacrificio de la rata mediante decapitación se recoge la sangre del animal, en un tubo previamente impregnado con heparina. La sangre se almacena en hielo hasta el momento de ser procesada. A continuación, la muestra de sangre se centrifuga a 4 300



x g durante 10 min a 4° C; se recoge el sobrenadante y se almacena a -20° C hasta el día del ensayo.

B. REACTIVOS

1. Tampón carbonato 0,05 M (pH 9,6)

2. PBM

Se prepara a una concentración de 10 µg/ml en tampón carbonato 0,05M pH 9,6.

3. Tampón de lavado

PBS 0,15 M pH 7,2-7,4

4. Solución de revelado

Se prepara ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) al 0,05 % en tampón citrato-fosfato 0,1M pH 5.

4. H₂O₂ 0,001%

C. MÉTODO

Se emplea una placa de cultivo de 96 pocillos. Se añaden primero a cada pocillo 100 µl de una disolución de PBM a una concentración de 10 µg/ml en tampón carbonato 0,05 M pH 9,6 y se incuba la placa durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiran los 100 µl de PBM y se bloquea cada pocillo con 100 µl de PBS/leche al 5% durante 2 h a 37°C. A continuación se añaden 100 µl de suero de rata diluido 1/256 a cada pocillo y se incuba la placa durante 1h a 37°C. Tras esta incubación, se lavan los pocillos tres veces con tampón PBS y se añaden 100 µl de anticuerpo secundario anti-rata conjugado con peroxidasa a una dilución 1/1000, incubando la placa durante 1 h a 37°C. Después, se retira el anticuerpo secundario no unido y se lavan los pocillos seis veces con tampón PBS. Tras los lavados, se añaden 100 µl de ABTS y 100 µl de H₂O₂ a cada pocillo y se incuba la placa en oscuridad durante 15 min para que tenga lugar la reacción cromogénica. Pasados los 15 min, se mide la absorbancia en cada pocillo a 450 nm empleando un espectrofotómetro de placas.



XVI. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE IFN- γ , TNF- α e IL-1 β EN EXTRACTOS CEREBRALES DE RATA

A. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se extrae el encéfalo y se disecan las áreas cerebrales deseadas siguiendo los pasos que se explican en el apartado III. A continuación, las áreas seleccionadas se colocan en 1 ml de PBS pH 7,4 y se homogenizan mediante sonicación. Después, las muestras se incuban durante 1 h a 4°C. Tras la incubación, los extractos tisulares obtenidos se centrifugan durante 15 min a 12 000 x g a 4°C. Se recoge el sobrenadante, se alicuota y se guarda a una temperatura de -20° C. Se utiliza una alícuota para medir la concentración de proteínas mediante el método de Lowry y col. (1951).

B. MÉTODO

Los niveles de IFN- γ , IL-1 β y TNF- α en los extractos tisulares de rata se determinan mediante ELISA, siguiendo el protocolo proporcionado por el kit de e-Biosciences. Se emplea una placa de 96 pocillos y se cubren los pocillos con 100 μ l de anticuerpo de captura diluido en tampón de tapizado 1X. La placa se incuba a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se retira el anticuerpo de captura no unido y se lavan los pocillos tres veces con tampón de lavado 1X. Después, se bloquea cada pocillo con 200 μ l de tampón de dilución 1X durante 1 h a temperatura ambiente. Se retira dicho tampón y se lavan de nuevo los pocillos tres veces con tampón de lavado. Posteriormente, se añaden a los pocillos de las filas A y B de la placa 100 μ l de la curva patrón en diluciones seriadas de 1:2 y 100 μ l de las muestras diluidas convenientemente y por duplicado en el resto de los pocillos. Se incuba la placa durante 2 h a temperatura ambiente, pasadas las cuales se realizan cinco lavados con tampón de lavado 1X. Se añaden 100 μ l de anticuerpo de detección diluido 1/250 en tampón de dilución 1X a cada pocillo y se incuba la placa a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se realizan cinco lavados con tampón de lavado 1X. Tras los lavados, se incuba la placa durante 30 min con 100 μ l de avidina-peroxidasa, diluida 1/250 en tampón de dilución 1X, a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos siete veces y se añaden 100 μ l de solución de revelado a cada pocillo, incubando la placa 15 min a temperatura ambiente.



Pasado ese tiempo, se detiene la reacción con 50 μ l de solución de parada 1X y se mide la absorbancia en un lector de placas a 450 nm.

Resultados

La ciencia se compone de errores que, a su vez, son pasos hacia la verdad.
Julio Verne.



I. EFECTO DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL AGUDA SOBRE EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO EN LA CORTEZA FRONTAL, HIPOCAMPO Y ESTRIADO DE LA RATA

A. SIGNOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD

Se observaron signos clínicos de la EAE en todas las ratas inmunizadas con PBM, como han descrito varios autores (Gold y col., 1997; Puerta y col., 2000). Las ratas inmunizadas con PBM mostraron flacidez de cola (grado 1) en los días 9-10 post-inmunización, y ataxia de los miembros posteriores (grado 3) en los días 12-15 post-inmunización (figura 13, panel derecho). La aparición de las alteraciones neurológicas se acompañó de una pérdida progresiva de peso corporal (figura 13, panel izquierdo) que no se observó en los animales control, en los que se demostró un aumento gradual de peso.

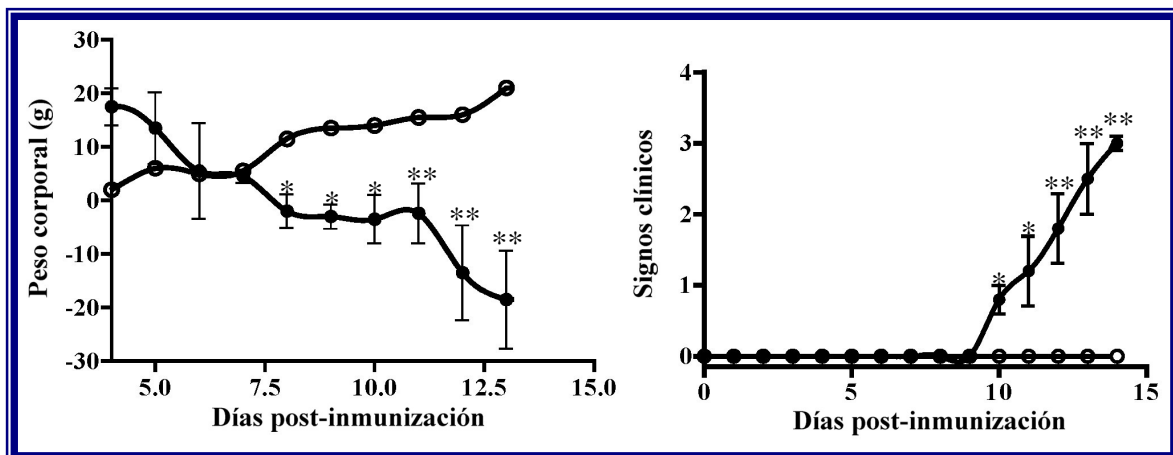


Figura 13. Curso clínico de la EAE en ratas Lewis. Panel izquierdo: evolución temporal del peso corporal en ratas Lewis control (○, n=5) y ratas Lewis con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) de grado 3 (●, n=5). Panel derecho: evolución temporal de los signos clínicos de la EAE en ratas Lewis control (○, n=5) y ratas Lewis con EAE de grado 3 (●, n=5). Se inmunizaron las ratas como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Se registraron diariamente el grado clínico y el peso corporal en todas las ratas antes de la inducción de la EAE y hasta el día 14 post-inmunización. Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

B. RESPUESTA HUMORAL Y NIVELES DE CITOQUINAS EN LA EAE AGUDA

Dada la relación existente entre la producción de anticuerpos contra glucoproteínas de mielina/oligodendrocitos y la fase clínica tanto de la EM, como de la EAE aguda, se midieron los niveles de anticuerpos contra la PBM mediante ELISA de

suelo de ratas control y ratas con EAE de grado 3. Se encontró un aumento de los niveles de anticuerpos anti-PBM en suero de todas las ratas inmunizadas (figura 14). Por otro lado se midieron los niveles de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF- α en extractos cerebrales de ratas control y ratas con EAE (grado 3), también mediante ELISA, observándose un aumento de ambas citoquinas en el día 10 (figuras 15 y 16), coincidiendo con el inicio de los signos clínicos de la enfermedad.

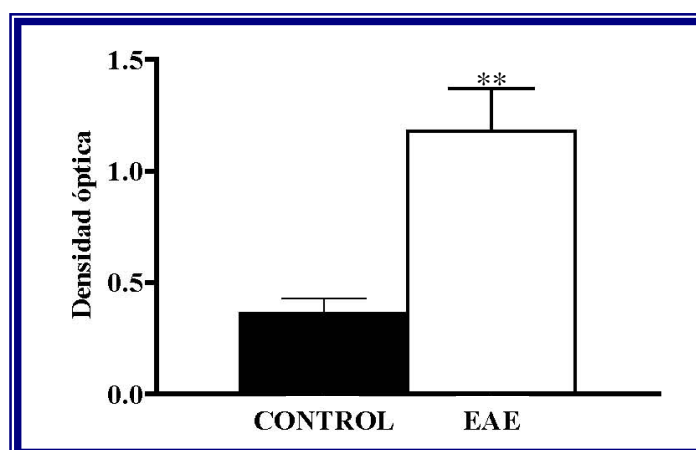


Figura 14. Niveles de anticuerpos contra la proteína básica de mielina (PBM) en suero sanguíneo de ratas Lewis control y ratas Lewis con encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE) de grado 3. Los sueros se incubaron en una microplaca de 96 pocillos revestida con PBM y los anticuerpos anti-PBM se detectaron usando una IgG policlonal de cabra anti-rata conjugada con peroxidasa de rábano. Los datos representan la media \pm E. S. M. de 5 ratas. Comparación estadística frente al control: ** $p < 0,01$.

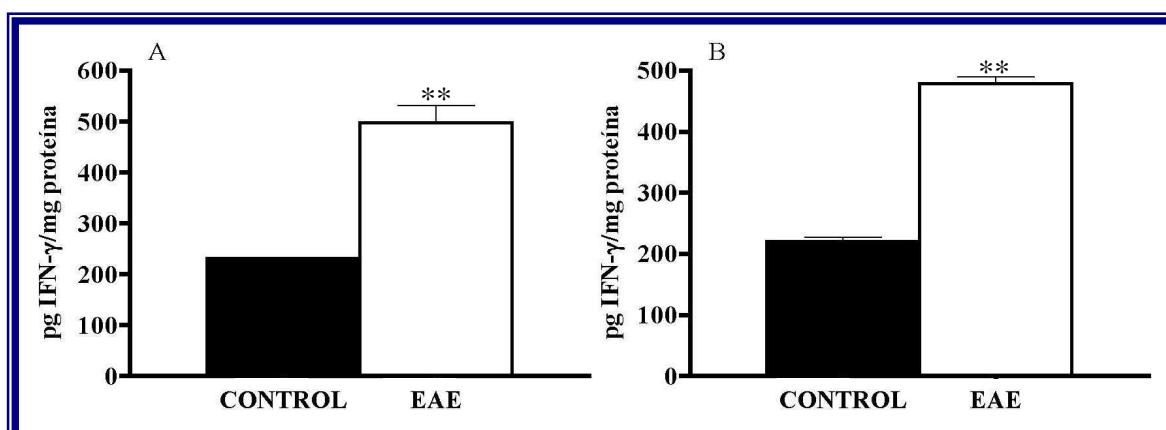


Figura 15. Niveles del interferón γ (IFN- γ) en extractos de hipocampo (panel A) y de estriado (panel B) de ratas Lewis control y ratas Lewis con EAE en grado 3. El ensayo se realizó mediante ELISA, según lo indicado en materiales y métodos. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** $p < 0,01$.

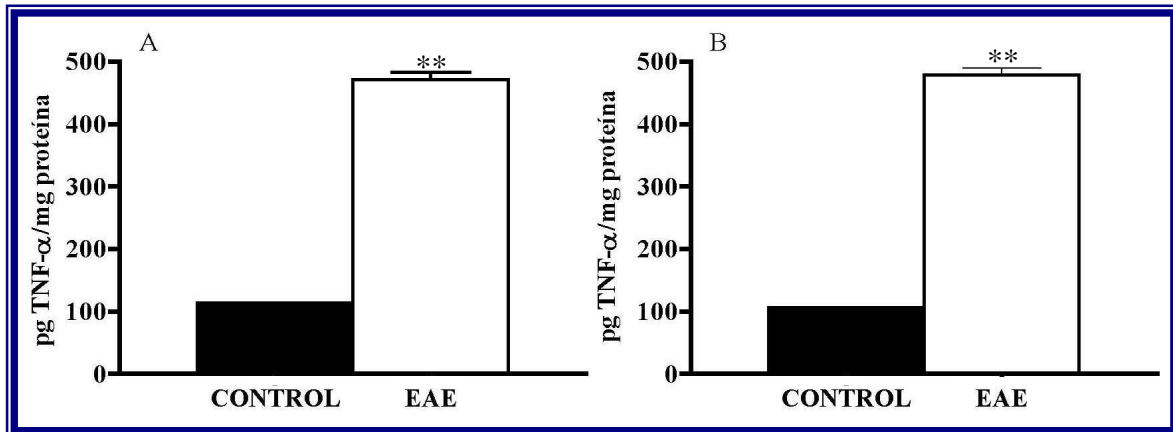


Figura 16. Niveles del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en extractos de hipocampo (panel A) y de estriado (panel B) de ratas Lewis control y ratas Lewis con EAE en grado 3. El ensayo se realizó mediante ELISA, según lo indicado en materiales y métodos. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** $p < 0,01$.

C. NIVELES DE SOMATOSTATINA EN LA EAE

El primer componente de sistema somatostatinérgico que analizamos fue el contenido de somatostatina inmunorreactiva (SRIF-IR), mediante radioinmunoensayo, en extractos cerebrales de las ratas Lewis control y con EAE. No se observaron cambios significativos en los niveles de SRIF-IR en la corteza frontal, hipocampo o estriado de ratas Lewis con EAE en grado 1 o en grado 3 en comparación con las ratas control (Tabla 7).

Tabla 7. Niveles de somatostatina inmunorreactiva (SRIF-IR) en corteza frontal, hipocampo y estriado de ratas Lewis con encefalomiелitis autoinmune experimental en grado 1 (n=5), grado 3 (n=5) o animales controles (n=10).

Área Cerebral	Control	EAE (Grado 1)	Control	EAE (Grado 3)
Corteza frontal	8,93 \pm 4,53	8,08 \pm 3,12	12,43 \pm 0,68	12,96 \pm 0,39
Hipocampo	9,94 \pm 0,69	8,10 \pm 0,81	9,73 \pm 0,58	11,43 \pm 2,65
Estríado	5,84 \pm 1,45	5,89 \pm 1,98	5,44 \pm 0,98	6,10 \pm 0,19

No se encontraron cambios significativos al comparar los dos grupos experimentales.

D. ALTERACIONES DE LOS RECEPTORES DE SOMATOSTATINA EN LA EAE

Estudios preliminares con membranas procedentes de las tres áreas cerebrales analizadas, corteza frontal, hipocampo y estriado, mostraron que la unión del trazador $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ es dependiente del tiempo, con un equilibrio aparente observado entre los 50 y 180 min a 30 °C. Por consiguiente, todos los experimentos posteriores se realizaron a 30 °C durante 60 min. Las membranas procedentes de corteza frontal, hipocampo y estriado de ratas con EAE aguda en grado 3, mostraron una capacidad para degradar el trazador similar al de las membranas control, con valores que no variaron en más de un 10% en todos los grupos experimentales.

La EAE aguda en grado 3 indujo un descenso significativo en la unión del $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF}$ a sus receptores específicos en membranas de hipocampo y estriado, pero no de corteza frontal de ratas Lewis con EAE aguda en grado 3 en comparación con las ratas control (figuras 17-19, Tabla 7). El grado 1 de la enfermedad, sin embargo, no alteró dicho parámetro en ninguna de las áreas cerebrales analizadas (Tabla 8).

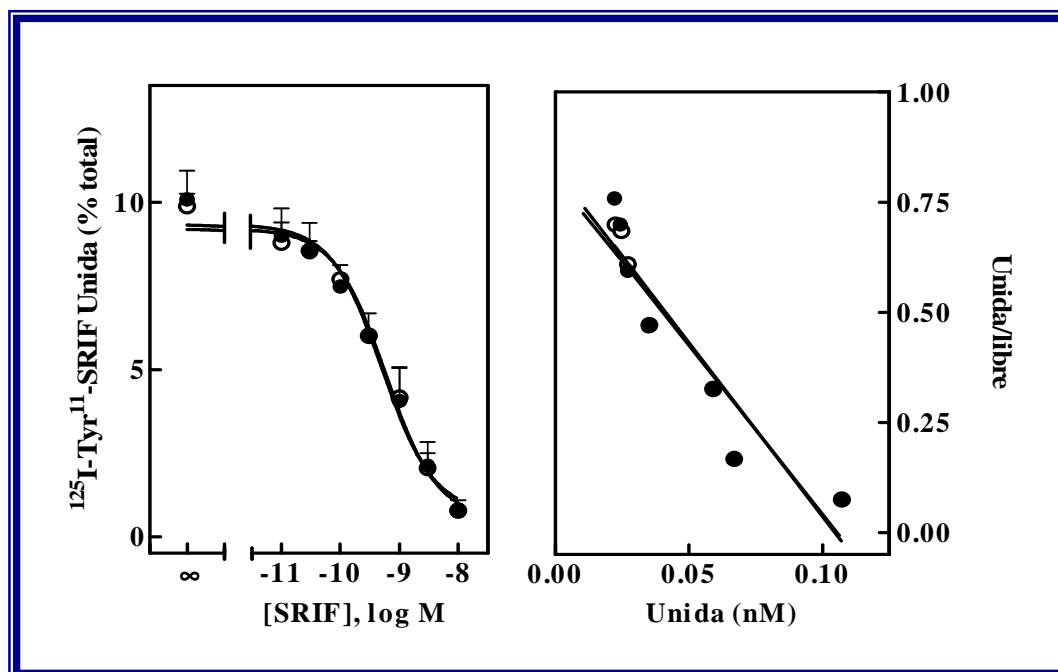


Figura 17. Efecto de la EAE sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de corteza frontal de rata. Panel izquierdo: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-somatostatina-14}$ ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$, 250 pM) a membranas de corteza frontal de rata por SRIF fría. Las membranas (0,15 mg proteína/ml) se incubaron durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF}$ y de concentraciones crecientes de péptido frío. Los puntos corresponden a ratas control (o, n = 5) o ratas Lewis con grado 3 (●, n = 5) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda. Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Panel derecho: análisis de Scatchard de los datos de unión.

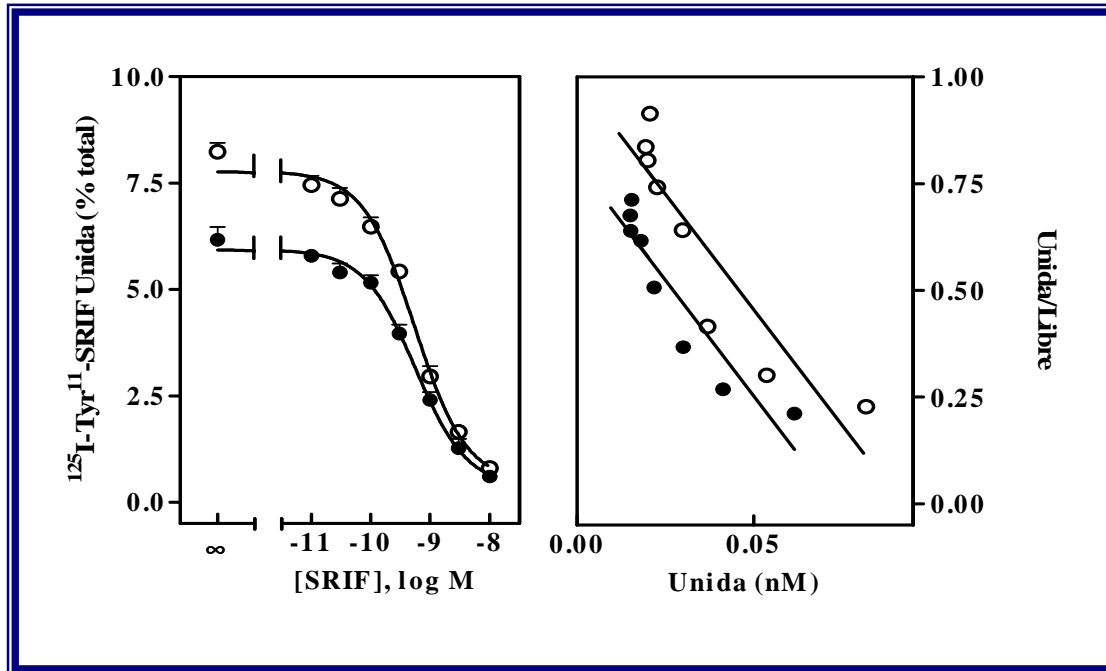


Figura 18. Efecto de la EAE sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de hipocampo de rata. Panel izquierdo: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-somatostatina-14}$ ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$, 250 pM) a membranas de hipocampo de rata por SRIF fría. Las membranas (0,15 mg proteína/ml) se incubaron durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF}$ y de concentraciones crecientes de péptido frío. Los puntos corresponden a ratas control (o, n = 5) o ratas Lewis con grado 3 (•, n = 5) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda. Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Panel derecho: análisis de Scatchard de los datos de unión.

Tabla 8. Parámetros de equilibrio de la unión de la somatostatina a membranas aisladas de corteza frontal, hipocampo o estriado de ratas Lewis con grado 1 (n = 5) o 3 (n = 5) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda o de ratas control (n = 10).

	Corteza frontal		Hipocampo		Estriado	
	Bmáx	Kd	Bmáx	Kd	Bmáx	Kd
Control	976 \pm 37	0,67 \pm 0,12	452 \pm 13	0,59 \pm 0,03	223 \pm 88	0,93 \pm 0,16
EAE grado 1	941 \pm 11	0,63 \pm 0,49	484 \pm 21	0,58 \pm 0,01	211 \pm 55	0,92 \pm 0,01
Control	514 \pm 10	0,57 \pm 0,12	515 \pm 30	0,77 \pm 0,12	177 \pm 10	0,43 \pm 0,09
EAE grado 3	520 \pm 14	0,58 \pm 0,09	389 \pm 24**	0,77 \pm 0,09	84 \pm 4**	0,44 \pm 0,06

Los parámetros de unión se calculan a partir de las representaciones de Scatchard por regresión lineal. Las unidades de Kd son nM y las unidades para la B máx. son femtomoles de SRIF unida por mg de proteína. Los resultados representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Cada experimento se realizó por duplicado. Comparación estadística frente al control: ** p<0,01

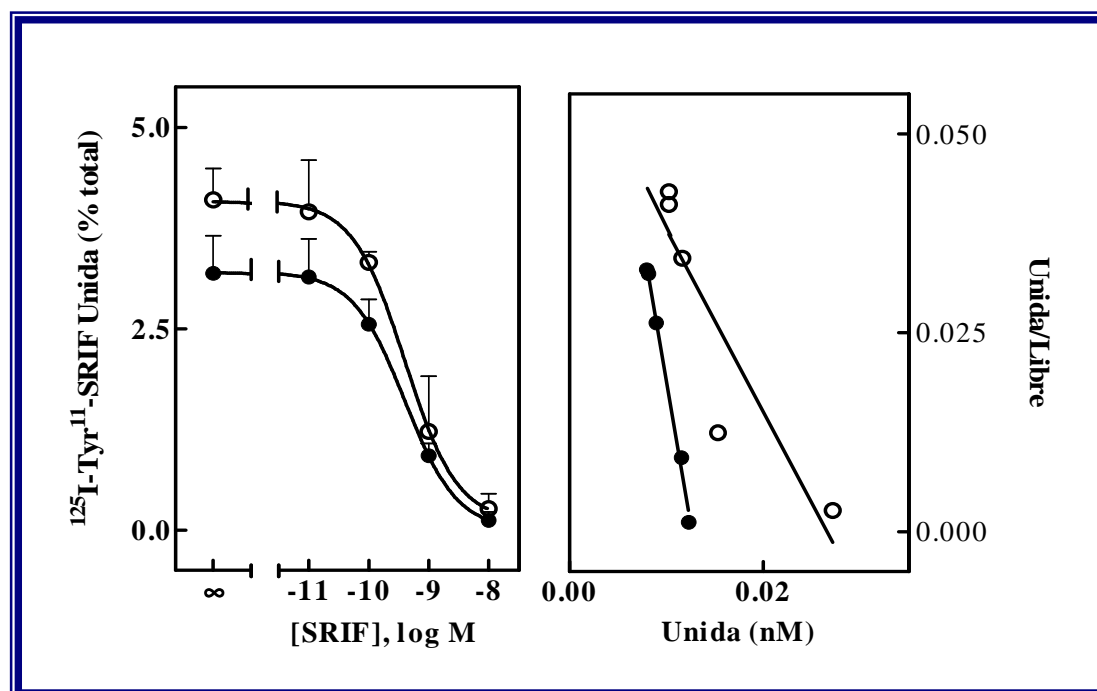


Figura 19. Efecto de la EAE sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de estriado de rata. Panel izquierdo: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-somatostatina-14}$ ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$, 250 pM) a membranas de estriado de rata por SRIF fría. Las membranas (0,15 mg proteína/ml) se incuban durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF}$ y de concentraciones crecientes de péptido frío. Los puntos corresponden a ratas control (o, n = 5) o ratas Lewis con grado 3 (•, n = 5) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda. Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Panel derecho: análisis de Scatchard de los datos de unión.

Dado que la SRIF ejerce su actividad a través de la unión a cinco subtipos de receptores, sst1-sst5, y que el trazador empleado en los ensayos de unión, la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$, se une con similar afinidad a los mismos, nos planteamos profundizar en la disminución observada en la densidad total de receptores analizando la expresión de cada subtipo. Para ello, se midieron por western blot los niveles proteicos de sst1, sst2, sst3 y sst4, al ser éstos más abundantes en corteza frontal, hipocampo y estriado. No se detecta apenas expresión de sst5 en estas áreas cerebrales, por lo que este subtipo no se analizó. Los resultados obtenidos mostraron un descenso significativo en los niveles proteicos del receptor sst2 en hipocampo (figura 21A) y estriado (figura 22A) de ratas con EAE aguda en grado 3, sin cambios significativos en la corteza frontal (figura 20A), en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos de unión. La EAE aguda no modificó la expresión de los subtipos sst1, sst3 o sst4 en ninguna de las áreas cerebrales analizadas.

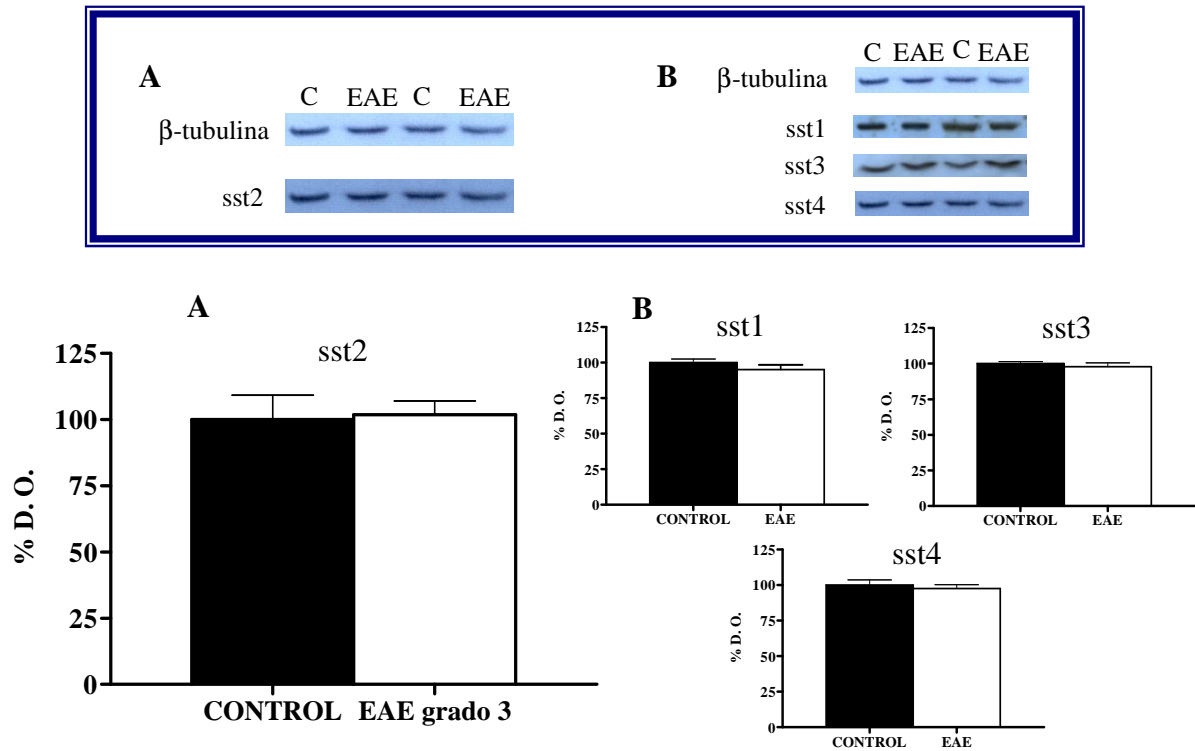


Figura 20. Efecto de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda sobre los niveles proteicos de los subtipos sst1-sst4 en corteza frontal de rata. Panel superior: autorradiografías derivadas de la inmunodetección del subtipo sst2 (panel A) y sst1, sst3 y sst4 (panel B) en membranas de corteza frontal de ratas control (C, n = 5) y ratas con EAE en grado 3 (EAE, n= 5). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos policlonales de cabra anti-sst1, anti-sst2, anti-sst3 o anti-sst4, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las figuras mostradas son representativas de otros cinco ensayos. La β -tubulina se utilizó como control de carga. Panel inferior: análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección del receptor sst2 (panel A) y sst1, sst3 o sst4 (panel B) en membranas de corteza frontal de ratas control (barra negra) y de ratas con EAE en grado 3 (barra blanca). Se les asignó un valor arbitrario de 100 a las densidades ópticas de las bandas correspondientes al grupo control. La densidad óptica de las bandas correspondientes al grupo de ratas con EAE se representa como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas.

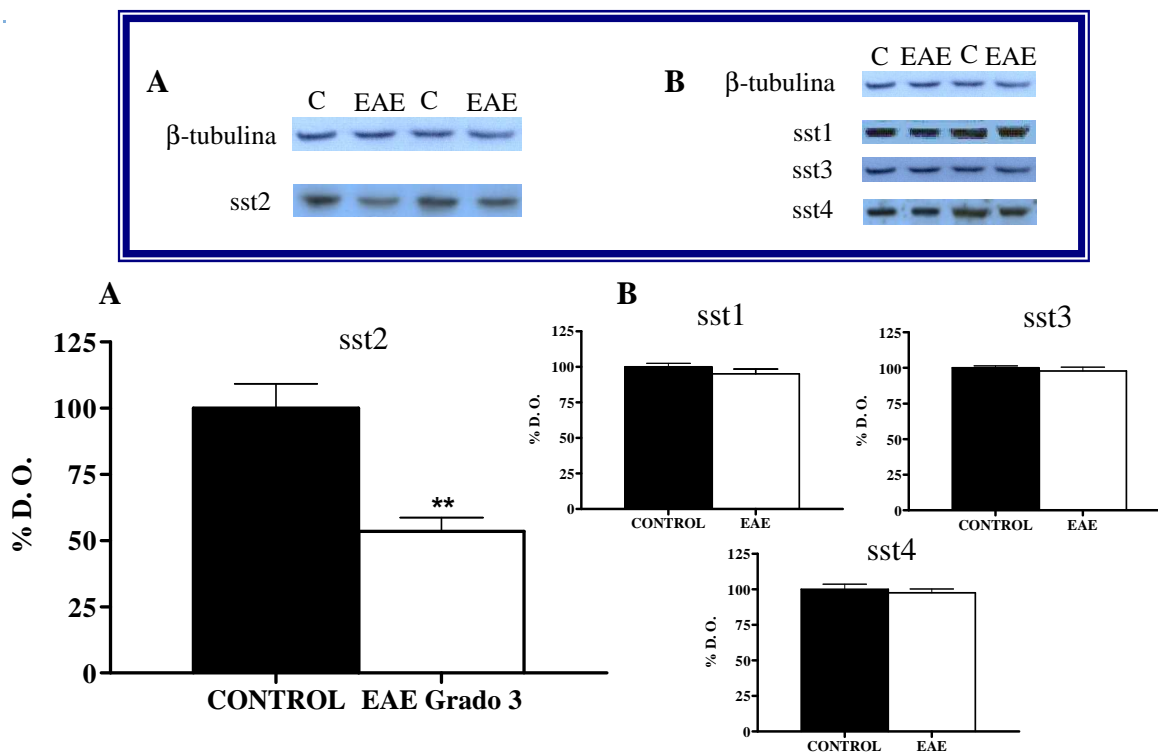


Figura 21. Efecto de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda sobre los niveles proteicos de los subtipos sst1-sst4 en hipocampo de rata. Panel superior: autorradiografías derivadas de la inmunodetección del subtipo sst2 (panel A) y sst1, sst3 y sst4 (panel B) en membranas de hipocampo de ratas control (C, n = 5) y ratas con EAE en grado 3 (EAE, n= 5). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos policlonales de cabra anti-sst1, anti-sst2, anti-sst3 o anti-sst4, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las figuras mostradas son representativas de otros cinco ensayos. La β -tubulina se utilizó como control de carga. Panel inferior: análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección del receptor sst2 (panel A) y sst1, sst3 o sst4 (panel B) en membranas de hipocampo de ratas control (barra negra) y de ratas con EAE en grado 3 (barra blanca). Se les asignó un valor arbitrario de 100 a las densidades ópticas de las bandas correspondientes al grupo control. La densidad óptica de las bandas correspondientes al grupo de ratas con EAE se representa como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** p < 0,01.

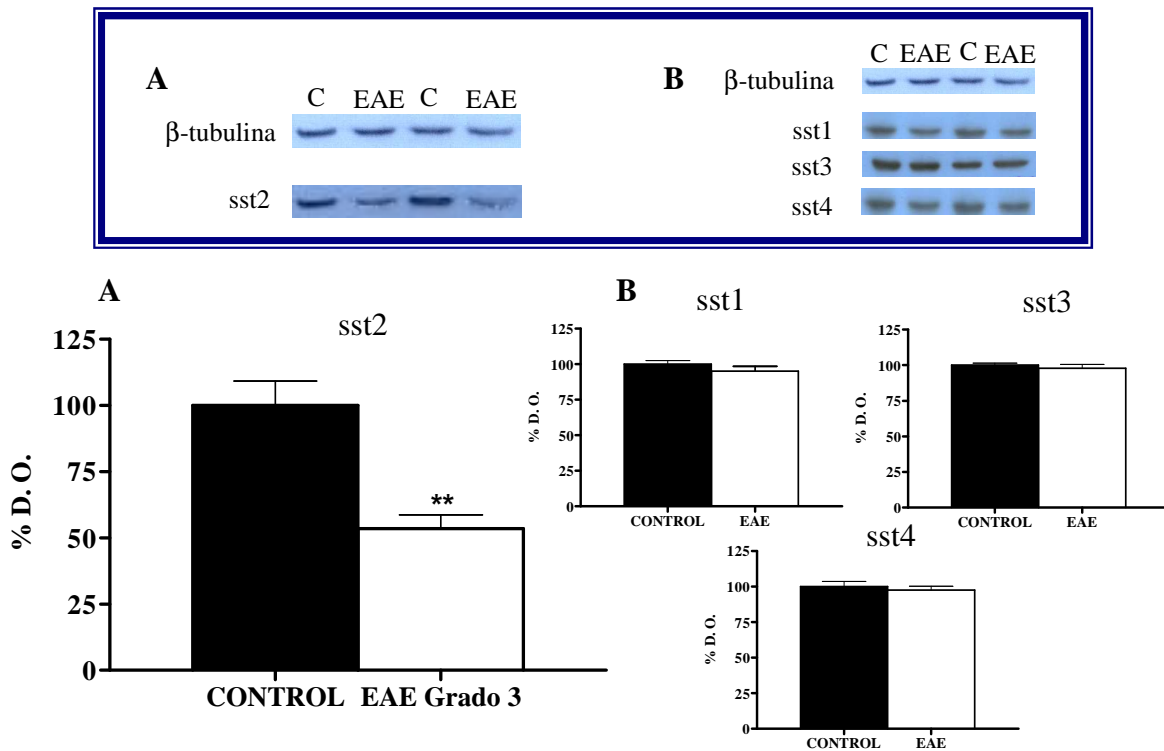


Figura 22. Efecto de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda sobre los niveles proteicos de los subtipos sst1-sst4 en estriado de rata. Panel superior: autorradiografías derivadas de la inmunodetección del subtipo sst2 (panel A) y sst1, sst3 y sst4 (panel B) en membranas de estriado de ratas control (C, n = 5) y ratas con EAE en grado 3 (EAE, n= 5). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos policlonales de cabra anti-sst1, anti-sst2, anti-sst3 o anti-sst4, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las figuras mostradas son representativas de otros cinco ensayos. La β-tubulina se utilizó como control de carga. Panel inferior: análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección del receptor sst2 (panel A) y sst1, sst3 o sst4 (panel B) en membranas de estriado de ratas control (barra negra) y de ratas con EAE en grado 3 (barra blanca). Se les asignó un valor arbitrario de 100 a las densidades ópticas de las bandas correspondientes al grupo control. La densidad óptica de las bandas correspondientes al grupo de ratas con EAE se representa como un porcentaje del control. Los datos representan la media ± E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** p < 0,01.

En vista de los resultados obtenidos, se midieron los niveles de ARNm del sst2 por RT-PCR a tiempo real en hipocampo y estriado con el fin de esclarecer si la reducción del sst2 observada, podría ser consecuencia de una menor expresión del gen. Los resultados obtenidos por RT-PCR a tiempo real revelaron una profunda reducción en los niveles de ARNm del sst2 en ambas áreas cerebrales de ratas con EAE en grado 3, en comparación con los valores control (figura 24). El análisis de la integridad del ARN, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, muestra que no hubo degradación en ninguna de las muestras de ARN (figura 23).



Figura 23. Película representativa de la integridad del ARN, donde se observan las dos bandas intactas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S.

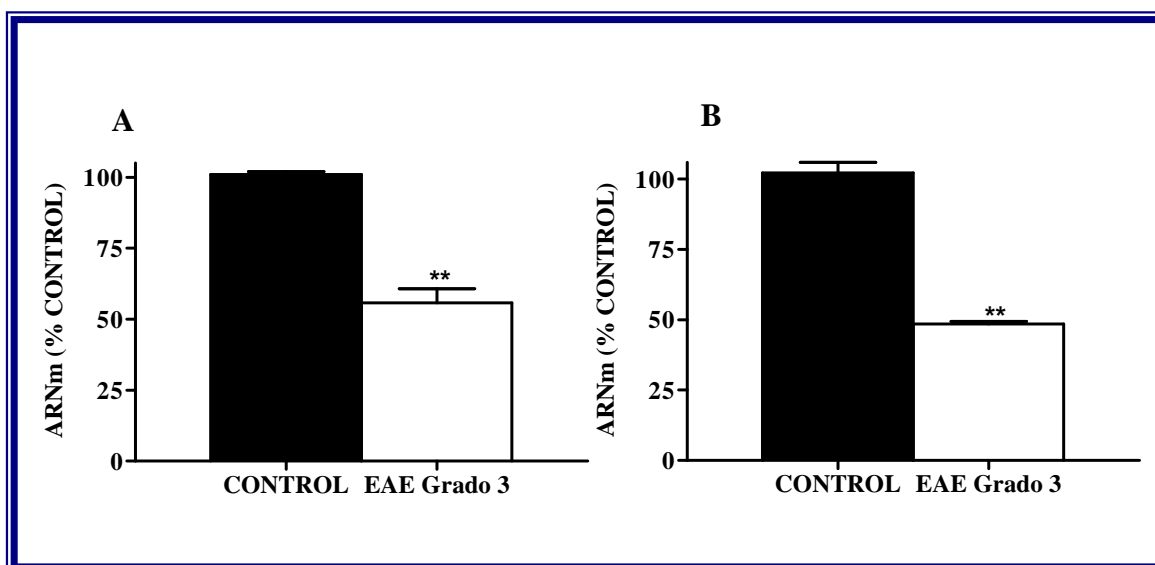


Figura 24. Contenido relativo del ARNm del receptor de somatostatina sst2 en el hipocampo (panel A) y el estriado (panel B) de ratas control (barra negra) y ratas con grado 3 de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda (barra blanca) determinado por transcripción inversa seguida por PCR a tiempo real. Los valores se presentan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** $p < 0,01$

Está bien establecido que el promotor del gen del sst2 contiene un elemento de respuesta a AMPc (CRE), al que se le une la proteína CREB fosforilada (p-CREB). La unión de dicho factor de transcripción regula la expresión del gen. Por ello, nos planteamos analizar el grado de expresión proteica de p-CREB con objeto de evaluar si la EAE aguda podría alterar sus niveles y así, modificar la tasa de transcripción del gen de sst2. Los ensayos de western blot permiten concluir que la cantidad de p-CREB en el hipocampo y estriado de las ratas con EAE aguda en grado 3 es similar a la de los animales control (figura 25).

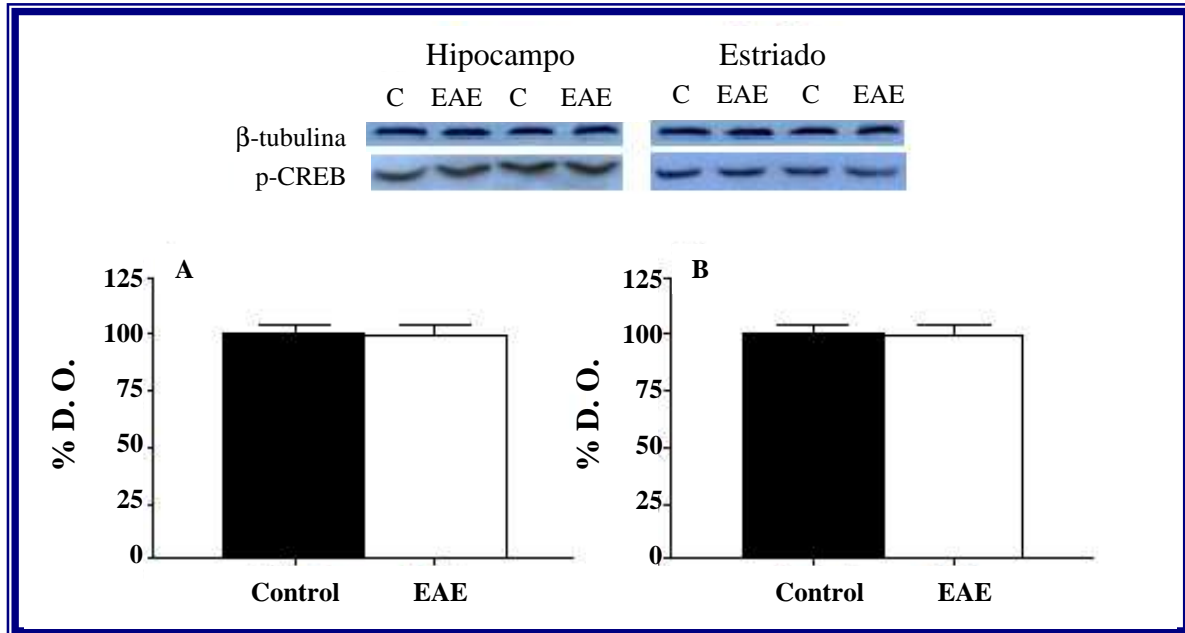


Figura 25. Efecto de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda sobre los niveles proteicos de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) fosforilada (p-CREB). **Panel superior:** autorradiografías derivadas de la inmunodetección de p-CREB en muestras de hipocampo y estriado de ratas control (C, n = 5) y ratas con EAE en grado 3 (EAE, n = 5). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos policlonales de cabra anti-p-CREB, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las figuras mostradas son representativas de otros tres ensayos. La β -tubulina se utilizó como control de carga. **Panel inferior:** análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección de p-CREB en muestras de hipocampo (panel A) y estriado (panel B) de ratas control (barra negra) y de ratas con EAE en grado 3 (barra blanca). Se les asignó un valor arbitrario de 100 a las densidades ópticas de las bandas correspondientes al grupo control. La densidad óptica de las bandas correspondientes al grupo de ratas con EAE se representa como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas.

E. IMPLICACIÓN DE LAS GRKS EN LA REDUCCIÓN DEL RECEPTOR *sst2*

Diversos trabajos han descrito un papel primordial de las GRKs en la desensibilización y posterior internación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR). De las 7 isoformas identificadas hasta la fecha, se expresan niveles elevados de los subtipos GRK2, GRK5 y GRK6 en la formación hipocampal así como en el estriado (Erdtman-Vourliotis y col., 2001; García-Sevilla y col., 2004). Mediante diferentes enfoques experimentales se ha establecido una relación entre alteraciones en la señalización por GPCRs y cambios tanto en la actividad como en la expresión de determinadas GRKs. Tulipano y col. (2004) han demostrado que la GRK2 en particular, fosforila al receptor *sst2A* en células HEK293 transfectadas con GRK2 y dicho receptor. Asimismo, estos autores demostraron que la sobreexpresión de GRK2 en estas células promueve un aumento en la fosforilación del receptor *sst2*, facilitando así el

reclutamiento de la β -arrestina 2 a la membrana plasmática. Por consiguiente, en vista de estos hallazgos y de la disminución en la expresión del sst2 inducida por la EAE aguda, nos planteamos la posibilidad de que una reducción en los niveles de alguna de estas GRKs (GRK2, GRK5 y/o GRK6) podría ser responsable, al menos en parte, de una menor fosforilación, y por ende, internación del sst2. Para evaluar esta hipótesis, se midieron los niveles proteicos de GRK2, GRK5 y GRK6 mediante western blot. Los resultados obtenidos no muestran cambios significativos entre las ratas controles y las ratas con EAE aguda (figura 26).

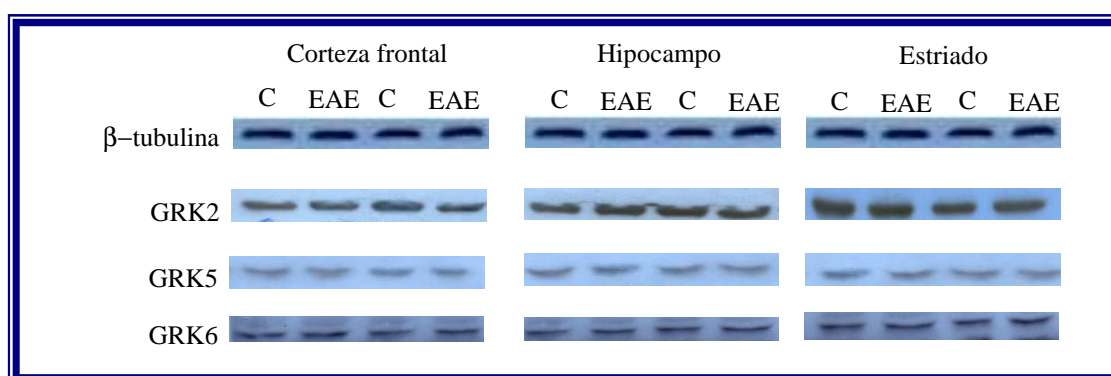


Figura 26. Autorradiografías procedentes de la inmunodetección de las isoformas 2, 5 y 6 de las kinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK2, GRK5 y GRK6) en membranas de corteza frontal, hipocampo y estriado de rata. C corresponde a ratas control (n = 5) y EAE a ratas con grado 3 de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda. Las proteínas de membrana se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos policlonales de conejo anti-GRK5 y anti-GRK6 y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GRK2. Cada experimento es representativo de otros cinco. Como control de carga se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina.

F. EFECTO DE LA EAE SOBRE EL EFECTOR ADENILATO CICLASA

Una de las vías de señalización de los receptores de SRIF es la inhibición de la enzima AC. Por lo tanto, el siguiente paso fue investigar el efecto de la EAE aguda sobre la funcionalidad del sistema somatostatinérgico. Para ello, se investigó la actividad de la AC en condiciones basales y estimuladas por forskolina (FK) así como la capacidad de la SRIF para inhibir dicha actividad en membranas de corteza frontal, hipocampo y estriado de ratas control y ratas con EAE aguda y controles. En hipocampo y estriado de las ratas con grado 3 de EAE aguda, se encontró una disminución en la inhibición mediada por SRIF de la actividad AC basal y estimulada por FK en comparación con las ratas control (tablas 9, 10 y 11). No se observaron cambios en este parámetro en la corteza frontal de las ratas. Para averiguar si dichos cambios estaban relacionados con alteraciones en la



expresión de la AC, se midió la respuesta de la enzima al diterpeno FK (10^{-5} M), que actúa directamente sobre la subunidad catalítica. No se detectaron cambios significativos en las veces de estimulación por FK de la actividad AC basal entre las ratas con EAE aguda y las ratas control en ninguna de las áreas cerebrales analizadas.

Tabla 9. Actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) (pmol AMPc/min/mg proteína) en presencia o ausencia de forskolina (FK) (10^{-5} M) o somatostatina (SRIF) (10^{-4} M) en membranas de corteza frontal de ratas Lewis control (n=5) y de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda en grado 1 (n=5) y grado 3 (n=5).

	CONTROL	EAE (g. 1)	CONTROL	EAE (g. 3)
Actividad				
Basal	392,3 ± 17,1	384,7 ± 16,4	389,5 ± 56,1	391,0 ± 45,3
+10^{-4} M SRIF	282,0 ± 89,0	280,8 ± 47,7	278,0 ± 45,6	285,4 ± 31,0
+10^{-5} M FK	687,8 ± 113,2	683,2 ± 153,7	677,2 ± 34,5	680,2 ± 33,3
+10^{-5} M FK + 10^{-4} M SRIF	454,4 ± 77,2	452,5 ± 84,6	448,9 ± 43,2	450,3 ± 55,3
Veces de estimulación con FK	1,8 ± 0,5	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,4
% Inhibición				
Basal	27,9 ± 4,9	27,0 ± 2,4	28,6 ± 4,3	27,0 ± 2,3
+10^{-5} M FK	33,9 ± 8,6	33,8 ± 13,9	33,7 ± 3,2	33,8 ± 3,3

Los valores representan la media ± E. S. M. de cinco ratas. Cada experimento fue realizado por duplicado.



Tabla 10. Actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) (pmol AMPc/min/mg proteína) en presencia o ausencia de forskolina (FK) (10^{-5} M) o somatostatina (SRIF) (10^{-4} M) en membranas de hipocampo de ratas Lewis control (n=5) y de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda en grado 1 (n=5) y grado 3 (n=5).

	CONTROL	EAE (g. 1)	CONTROL	EAE (g. 3)
Actividad				
Basal	171,7 ± 6,8	178,4 ± 4,2	161,5 ± 6,3	156,7 ± 8,1
+10⁻⁴ M SRIF	113,5 ± 7,3	111,1 ± 9,9	113,4 ± 6,9	127,9 ± 3,9 *
+10⁻⁵ M FK	352,5 ± 5,1	351,5 ± 16,5	352,1 ± 6,3	357,6 ± 7,9
+10⁻⁵ M FK + 10⁻⁴ M SRIF	232,4 ± 12,0	228,2 ± 15,4	232 ± 4,8	279,2 ± 9,1 *
Veces de estimulación con FK	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,9
% Inhibición				
Basal	30,7 ± 2,3	37,6 ± 5,8	30,2 ± 1,2	18,5 ± 1,0 **
+10⁻⁵ M FK	33,8 ± 3,8	34,5 ± 4,4	33,8 ± 0,7	21,9 ± 0,6 **

Los valores representan la media ± E. S. M. de cinco ratas. Cada experimento fue realizado por duplicado. Comparación estadística frente al control: * p < 0,05; ** p < 0,01.

Tabla 11. Actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) (pmol AMPc/min/mg proteína) en presencia o ausencia de forskolina (FK) (10^{-5} M) o somatostatina (SRIF) (10^{-4} M) en membranas de estriado de ratas Lewis control (n=5) y de ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda en grado 1 (n=5) o grado 3 (n=5).

	CONTROL	EAE (g. 1)	CONTROL	EAE (g. 3)
Actividad				
Basal	349,2 ± 36,2	338,8 ± 12,3	350,0 ± 27,1	358,9 ± 49,3
+10⁻⁴ M SRIF	234,9 ± 13,3	231,7 ± 10,1	265,6 ± 32,5	298,5 ± 27,7**
+10⁻⁵ M FK	545,8 ± 25,0	541,5 ± 26,5	552,1 ± 6,3	551,7 ± 14,5
+10⁻⁵ M FK + 10⁻⁴ M SRIF	301,1 ± 30,4	316,7 ± 15,4	336,4 ± 65,8	426,0 ± 39,1 *
Veces de estimulación con FK	1,5 ± 0,5	1,6 ± 0,6	1,6 ± 0,4	1,5 ± 0,9
% Inhibición				
Basal	32,7 ± 3,2	31,6 ± 3,3	24,1 ± 1,1	18,8 ± 1,0 **
+10⁻⁵ M FK	44,8 ± 7,5	41,5 ± 2,3	39,1 ± 2,7	22,8 ± 5,5 **

Los valores representan la media ± E. S. M. de cinco ratas. Cada experimento fue realizado por duplicado. Comparación estadística frente al control: ** p < 0,01.



G. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS G_i EN LA EAE

En vista de los resultados anteriores y dado que los receptores de SRIF se acoplan negativamente a la AC vía proteínas G_i , se evaluaron los niveles proteicos de las subunidades α_1 , α_2 y α_3 de las proteínas G_i mediante western blot en membranas de corteza frontal, hipocampo y estriado de ratas con EAE (grado 3) y ratas control. Los resultados obtenidos demuestran que la EAE (grado 3) no modifica la cantidad de dichas subunidades α_i en ninguna de las tres áreas cerebrales estudiadas (figura 27).

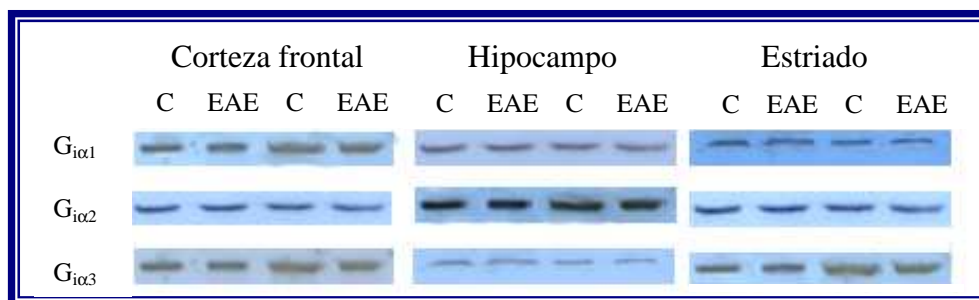


Figura 27. Autorradiografías procedentes de la inmunodetección de las subunidades α_1 , α_2 y α_3 de las proteínas G inhibitoras en membranas de corteza frontal, hipocampo y estriado de rata con grado 3 de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda en grado 3 y de ratas control (C). Las membranas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos monoclonales de ratón anti- $G_{i\alpha_1}$ y anti- $G_{i\alpha_2}$ y el anticuerpo policlonal de ratón anti- $G_{i\alpha_3}$. Cada experimento es representativo de otros 5.

II. EFECTO DE LA SAL DE CALCIO, MAGNESIO Y POTASIO DEL FOSFATO DE ETANOLAMINA SOBRE LAS ALTERACIONES DEL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO OBSERVADAS DURANTE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

Como se ha demostrado, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en grado 3 causa una serie de alteraciones en el sistema somatostatinérgico de la rata Lewis. Dado que distintos derivados de la etanolamina han demostrado tener un efecto neuroprotector, nos planteamos evaluar si las sales de calcio, magnesio y potasio del fosfato de etanolamina (PEA) son capaces de prevenir la aparición de los signos clínicos de la EAE así como las alteraciones del sistema somatostatinérgico previamente descritas.

A. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PEA SOBRE LA MANIFESTACIÓN DE LA EAE

Como se ha descrito anteriormente, las ratas inmunizadas con PBM presentan signos clínicos que siguen un curso reproducible en el tiempo (Gold y col., 1997; Puerta y col., 2000). Los signos clínicos de la EAE comenzaron en el día 10 post-inducción, aproximadamente, alcanzándose el grado 3 de la encefalomiелitis autoinmune experimental en el día 13 post-inmunización. Además de los signos neurológicos observados en las ratas que desarrollaron la enfermedad, se observó una pérdida de peso corporal en las ratas con EAE, mientras que los animales control mostraron un aumento gradual del peso corporal (figura 28).

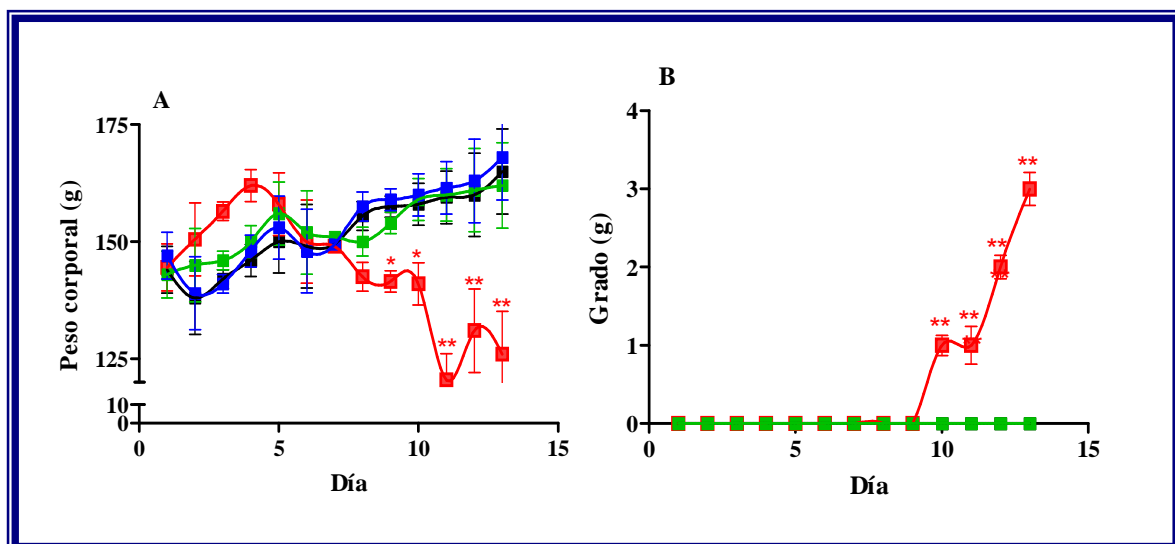


Figura 28. Curso clínico de la EAE en ratas Lewis. Panel A: representación de la variación diaria del peso corporal ratas control (■) frente a ratas control tratadas con fosfato de etanolamina (PEA) (■), ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda (■) en grado 3 y ratas con EAE aguda en grado 3 tratadas previamente a la inducción de la enfermedad con fosfato de etanolamina (PEA) (■). Cada punto representa la media \pm E. S. M. de los pesos observados para cada grupo experimental en un mismo día (n=5). Panel B: evolución de los signos clínicos de la EAE en ratas control (■) frente a ratas control tratadas con fosfato de etanolamina (PEA) (■), ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda (■) en grado 3 y ratas con EAE aguda en grado 3 tratadas previamente a la inducción de la enfermedad con fosfato de etanolamina (PEA) (■). Cada punto representa la media \pm E. S. M. de los pesos observados para cada grupo experimental en un mismo día (n=5). Comparación estadística frente al control: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Cuando las ratas con EAE se trataron con la sal de calcio, magnesio y potasio del fosfato de etanolamina (PEA) dos días antes de la inducción, no se observó reducción en el peso corporal de las ratas con respecto a los controles de la enfermedad (figura 28).

B. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE PEA SOBRE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA A PBM

Dado que la producción de anticuerpos que reaccionan con las glucoproteínas de mielina de oligodendrocitos se ha asociado a la fase clínica de la EM y la EAE aguda, se midieron los niveles séricos de anticuerpos anti-PBM en ratas control, ratas con EAE aguda (grado 3), ratas tratadas con PEA y ratas tratadas con PEA e inmunizadas con PBM mediante ELISA. Como se observa en la figura 29, el suero procedente de ratas con EAE aguda presentaba un aumento significativo de anticuerpos anti-PBM en el día 10 post-inmunización, mientras que la administración de PEA dos días previos a la inducción de la enfermedad y durante 15 días previno dicho incremento.

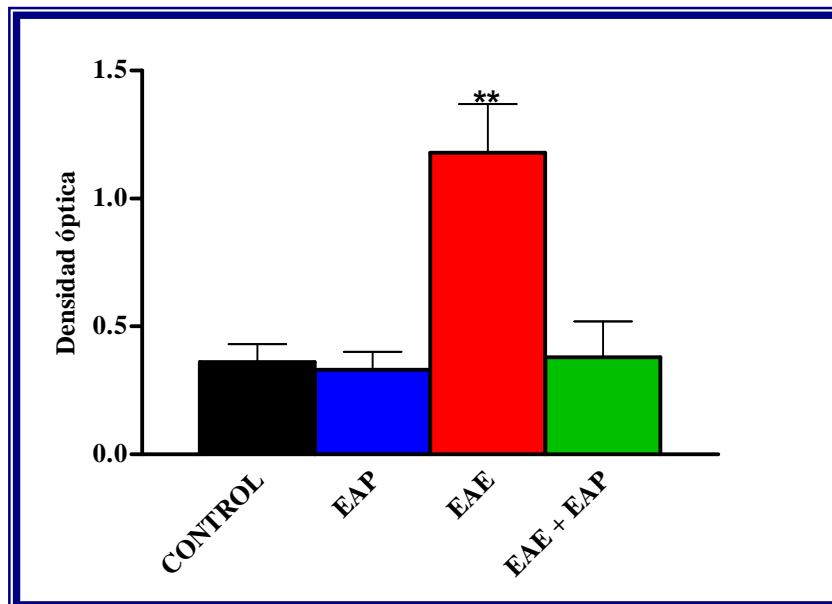


Figura 29. Niveles de anticuerpos anti-PBM en suero sanguíneo de ratas control, ratas control tratadas con PEA, ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda en grado 3 y ratas con EAE en grado 3 tratadas con PEA. Los sueros se incubaron en una microplaca de 96 pocillos revestida con PBM y los anticuerpos anti-PBM se detectaron usando una IgG policlonal de cabra anti-rata conjugada con peroxidasa. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** $p < 0,01$.

A continuación, se procedió a evaluar si la PEA mejoraba las alteraciones observadas en las ratas con EAE debido a su actividad anti-inflamatoria. Para ello, se midieron por ELISA los niveles de interferón γ (IFN- γ), interleuquina 1β (IL- 1β) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en extractos de hipocampo y estriado de ratas control, ratas tratadas con PEA, ratas con EAE aguda (en grado 3) y ratas con EAE tratadas con PEA. Los datos obtenidos no muestran alteración alguna en los niveles de IL- 1β (figura 30) en ninguna de las áreas cerebrales analizadas, mientras que se pone de manifiesto un

incremento notable de los niveles de TNF- α e IFN- γ (figura 31 y 32) en ratas con EAE en grado 3, tanto en hipocampo como en estriado, coincidiendo con el inicio de los signos clínicos de la enfermedad. Este incremento de los niveles de TNF- α e IFN- γ inducido por la enfermedad revierte a los valores control cuando las ratas con grado 3 de EAE son tratadas con PEA.

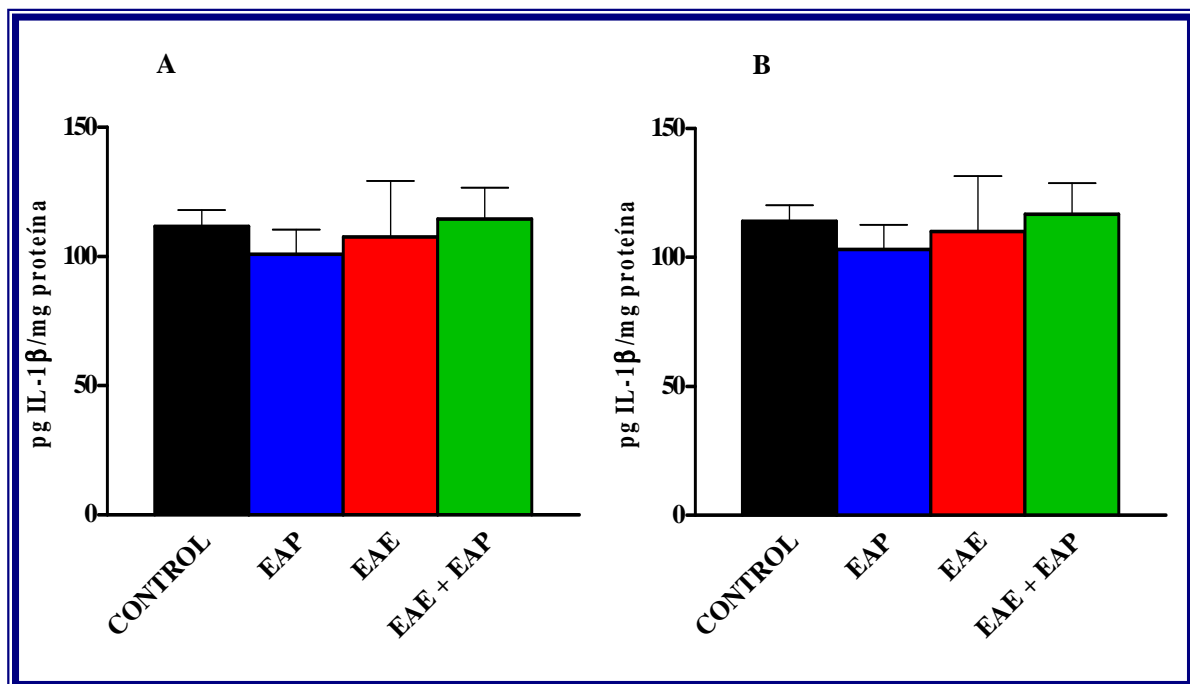


Figura 30. Niveles de interleuquina 1 β (IL-1 β) en extractos de hipocampo (panel A) y estriado (panel B) de ratas control, ratas tratadas con PEA, ratas con EAE en grado 3 y ratas con EAE tratadas con PEA. El ensayo se realizó según las instrucciones del fabricante del kit de ELISA. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas.

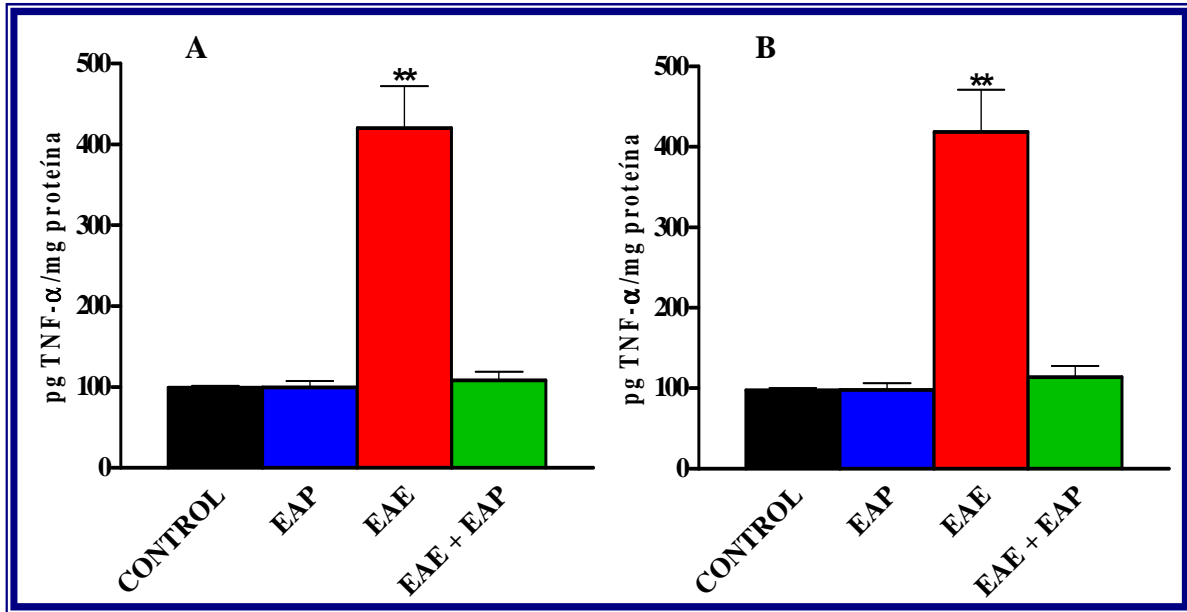


Figura 31. Niveles de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en extractos de hipocampo (panel A) y estriado (panel B) de ratas control, ratas tratadas con PEA, ratas con EAE en grado 3 y ratas con EAE tratadas con PEA. El ensayo se realizó según las instrucciones del fabricante del kit de ELISA. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** $p < 0,01$.

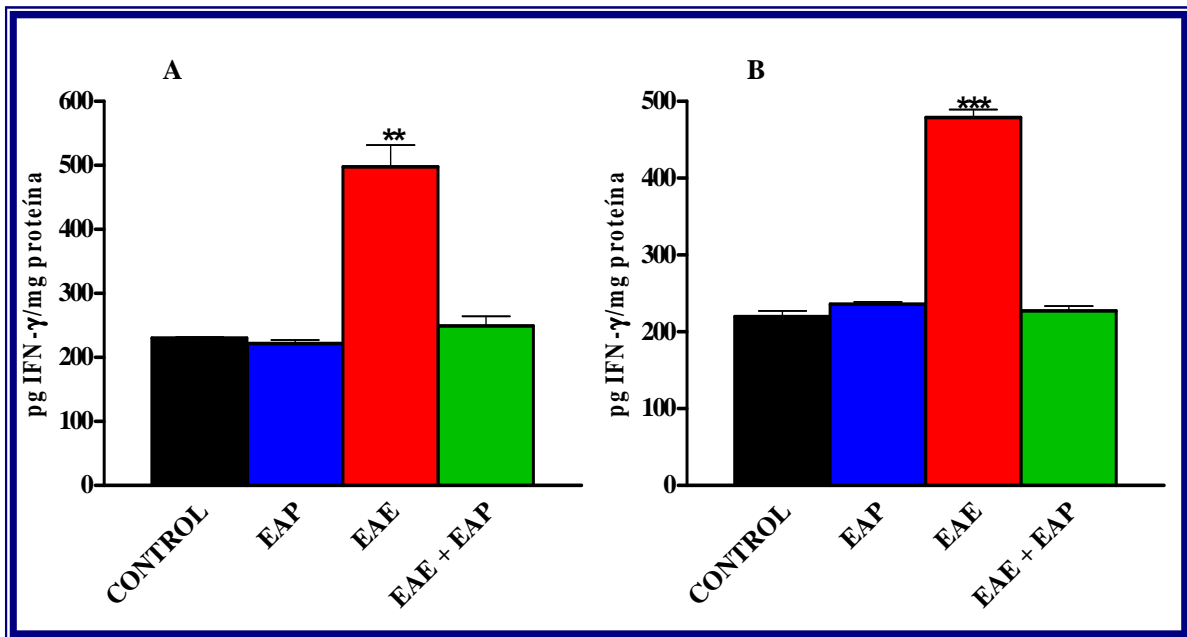


Figura 32. Niveles de interferón γ (IFN- γ) en extractos de hipocampo (panel A) y estriado (panel B) de ratas control, ratas tratadas con PEA, ratas con EAE en grado 3 y ratas con EAE tratadas con PEA. El ensayo se realizó según las instrucciones del fabricante del kit de ELISA. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** $p < 0,01$.

C. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Debido a la naturaleza neuroinflamatoria de la EAE se realizó un análisis histológico del estriado de ratas control, ratas con EAE, ratas tratadas con PEA y ratas con EAE y tratadas con PEA con el fin de determinar la presencia o ausencia de infiltrados inflamatorios. Mediante tinción con hematoxilina/eosina, se observó un aumento de la infiltración linfocitaria perivascular en el estriado de ratas con grado 3 de EAE (figura 33). Dicha infiltración se redujo a los niveles control en el estriado de las ratas con EAE a las que se les administró PEA.

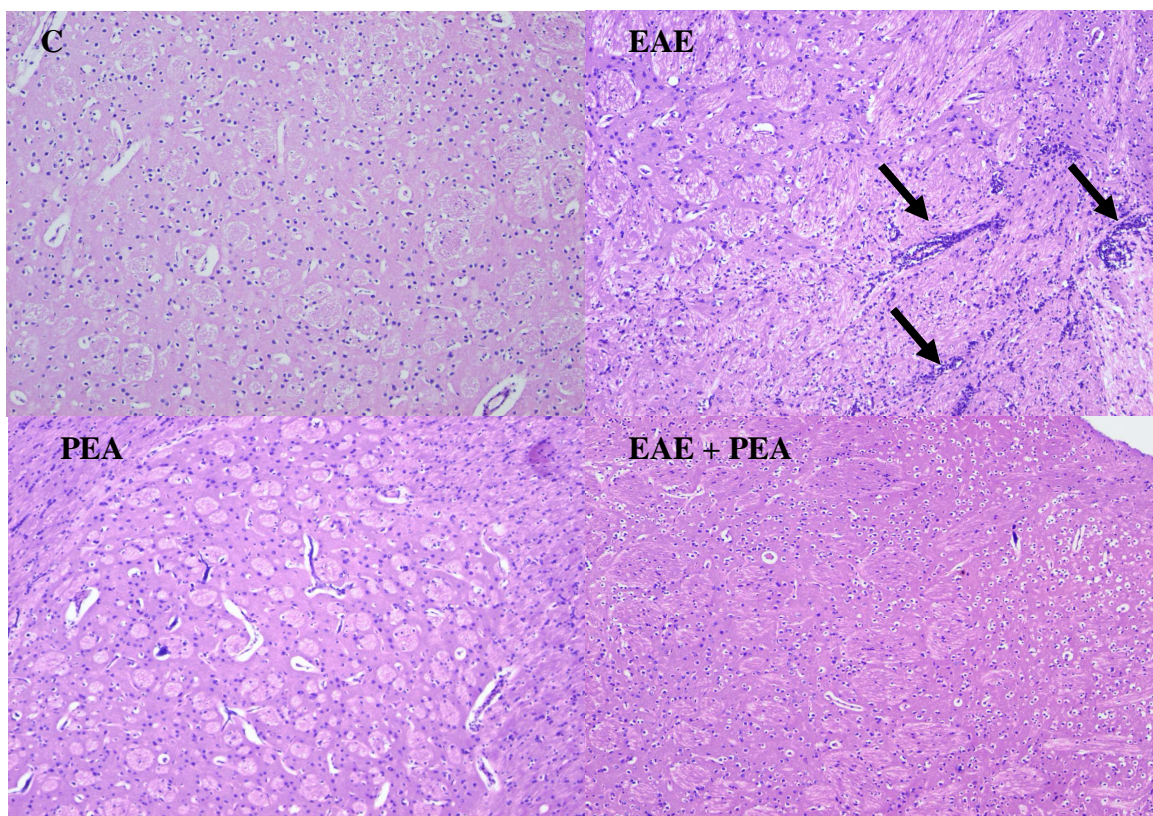


Figura 33. Secciones histológicas de estriado teñidas con hematoxilina/eosina. C: Estriado de rata control; PEA: Estriado procedente de rata control tratada con 600 mg/kg peso/día de fosfato de etanolamina; EAE: Inflamación perivascular linfocitaria con extensión parenquimatosa en cuerpo estriado de ratas con EAE en grado 3; EAE + PEA: Estriado procedente de ratas con EAE tratadas con 600 mg/kg peso/día.

D. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL PEA SOBRE LOS NIVELES DE SOMATOSTATINA

Con el fin de analizar si el PEA alteraba los niveles de somatostatina inmunorreactiva, se llevó a cabo un análisis del contenido de SRIF-IR en corteza frontal,



hipocampo o estriado de ratas control, ratas con EAE y ratas con EAE tratadas con PEA. No se observaron cambios significativos en el contenido de somatostatina inmunorreactiva (SRIF-IR) de la corteza frontal, hipocampo o estriado de rata (Tabla 12).

Tabla 12. Niveles de somatostatina inmunorreactiva (SRIF-IR) en corteza frontal, hipocampo y estriado de ratas Lewis con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda en grado 3 (n=5), animales controles (n=5) o animales con EAE aguda en grado 3 tratados con PEA (n=5).

Área cerebral	Control	EAE	EAE + PEA
Corteza frontal	12,43 ± 0,68	12,96 ± 0,19	12,34 ± 2,62
Hipocampo	9,94 ± 1,86	9,10 ± 1,91	9,16 ± 0,73
Estriado	6,94 ± 0,98	6,10 ± 1,01	6,34 ± 1,62

Los valores representan la media ± E. S. M. de cinco ratas.

E. EFECTO DEL PEA SOBRE EL SISTEMA RECEPTOR-EFECTOR DE LA SOMATOSTATINA

La EAE en grado 3 induce una reducción en el número de sitios de unión de la somatostatina en membranas aisladas de hipocampo y estriado de rata. El tratamiento con PEA a una dosis de 600 mg/kg peso/día revierte dicha reducción, observándose valores sin cambios en la constante de disociación, similares a los obtenidos con membranas procedentes de los animales control (figura 34 y 35; Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de la administración de PEA sobre los parámetros de equilibrio de la unión de la somatostatina a sus receptores en membranas procedentes del hipocampo de ratas Lewis control (n = 10), ratas control tratadas con PEA (n=5), ratas con grado 3 (n = 5) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda y ratas con EAE tratadas con PEA (n = 5).

		Receptores de SRIF	
		Bmáx (fmol/mg prot)	Kd (nM)
Hipocampo	Control	515 ± 30	0,77 ± 0,12
	PEA	577 ± 35	0,76 ± 0,29
	EAE	389 ± 24**	0,77 ± 0,09
	EAE + PEA	563 ± 21	0,77 ± 0,29
Estriado	Control	177 ± 10	0,43 ± 0,09
	PEA	169 ± 5	0,43 ± 0,12
	EAE	84 ± 4**	0,44 ± 0,06
	EAE + PEA	175 ± 12	0,41 ± 0,13

Los parámetros de unión se calculan a partir de las representaciones de Scatchard por regresión lineal. Las unidades de Kd son nM y las unidades de B máx. son femtomoles de SRIF unida por mg de proteína. Los resultados representan la media ± E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** p<0,01.

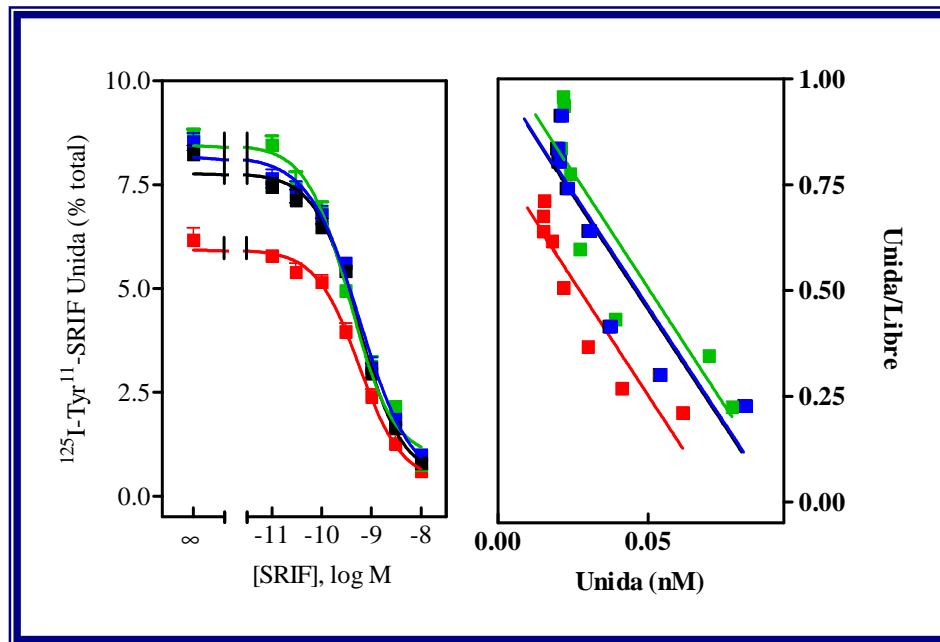


Figura 34. Efecto del PEA sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de hipocampo de rata. Panel izquierdo: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-somatostatina-14}$ ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$) a membranas de hipocampo de rata por la SRIF fría. Las membranas (0,15 mg proteína/ml) se incuban durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ y de concentraciones crecientes del péptido frío. Los puntos corresponden a ratas Lewis control (■, n = 5), control tratadas con PEA (■, n = 5), con grado 3 (■, n = 5) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda, y ratas con grado 3 de EAE aguda tratadas con 600 mg/kg peso/día de PEA (■, n = 5). Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco experimentos. Panel derecho: análisis de Scatchard de los datos de unión.

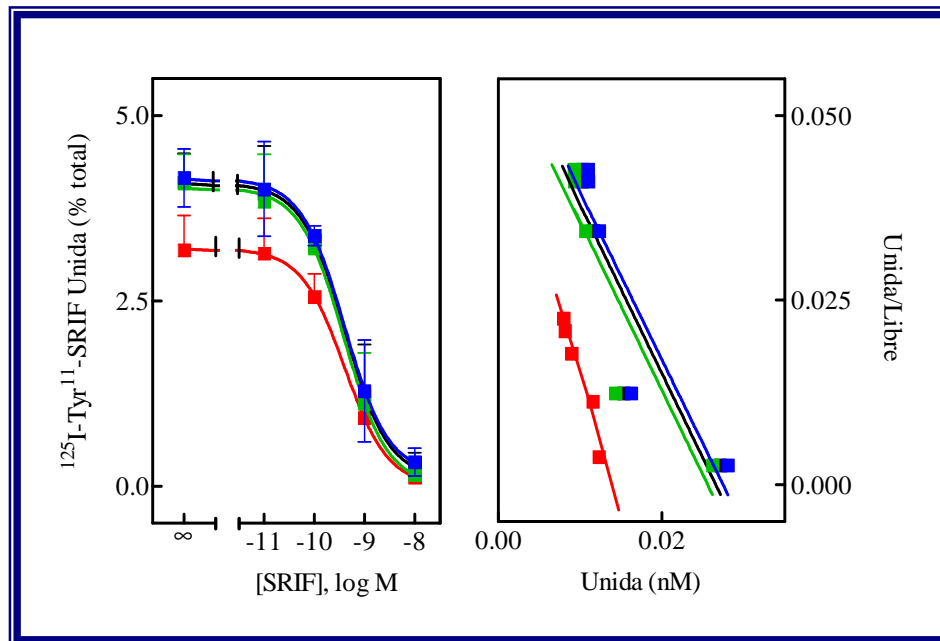


Figura 35. Efecto del PEA sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de estriado de rata. Panel izquierdo: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-somatostatina-14}$ ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$) a membranas de estriado de rata por la SRIF fría. Las membranas (0,15 mg proteína/ml) se incuban durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ y de concentraciones crecientes del péptido frío. Los puntos corresponden a ratas Lewis control (■, n = 5), control tratadas con PEA (■, n = 5), con grado 3 (■, n = 5) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda, y ratas con grado 3 de EAE aguda tratadas con 600 mg/kg peso/día de PEA (■, n = 5). Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco experimentos. Panel derecho: análisis de Scatchard de los datos de unión.

Sin embargo, el tratamiento con dosis más bajas de PEA en las ratas enfermas (300 mg/kg peso/día y 150 mg/kg peso/día) no condujo a una recuperación de los parámetros de equilibrio de unión de la SRIF a sus receptores (figuras 36 y 37) en ninguna de las áreas cerebrales analizadas.

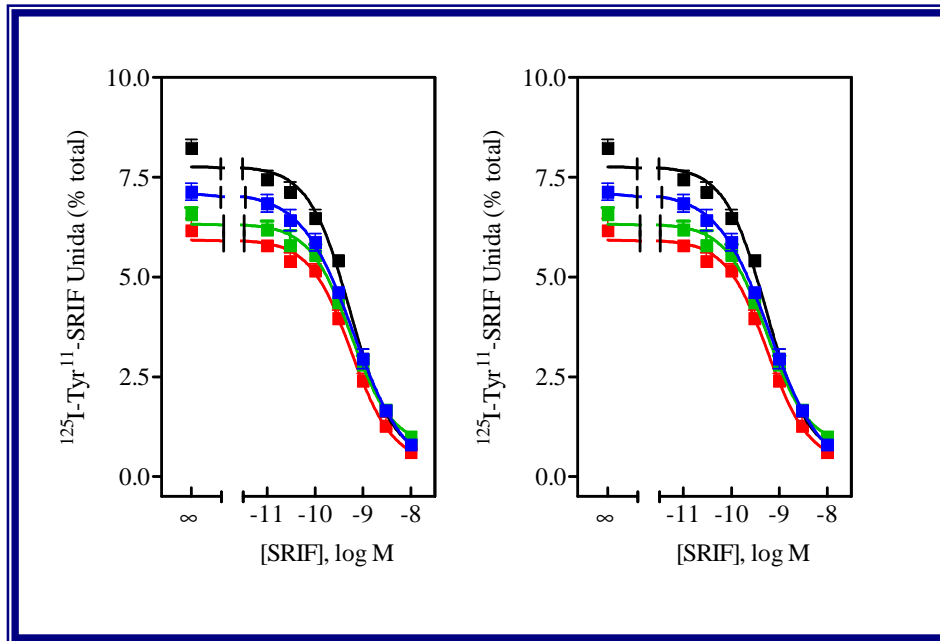


Figura 36. Efecto del PEA sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de hipocampo de rata. Panel izquierdo: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -somatostatina-14 ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF-14) a membranas de hipocampo de rata por la SRIF fría. Las membranas (0,15 mg proteína/ml) se incuban durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF y de concentraciones crecientes de péptido frío. Los puntos corresponden a ratas Lewis control (■, n = 5), control tratadas con PEA (■, n = 5), con grado 3 (■, n = 5) de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda, y ratas con grado 3 de EAE aguda tratadas con 300 mg/kg peso/día de PEA (■, n = 5). Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Panel derecho: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF a membranas de hipocampo de ratas Lewis control (■ n = 5), control tratadas con PEA (■, n = 5), ratas con grado 3 de EAE (■ n = 5) o ratas con grado 3 de EAE tratadas con 150 mg/kg peso/día de PEA (■ n = 5). Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas.

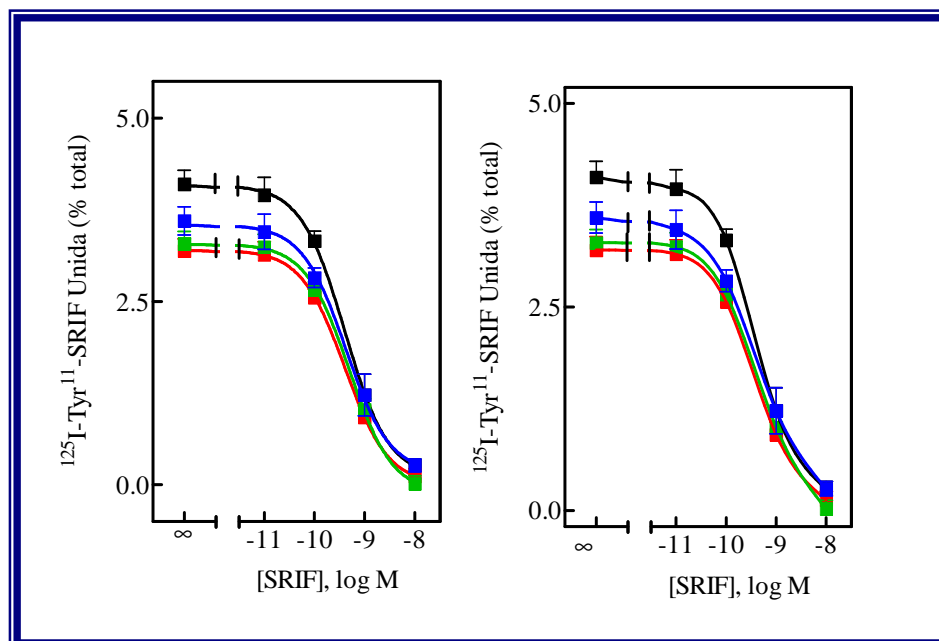


Figura 37. Efecto del PEA sobre la unión de la SRIF a sus receptores en membranas de estriado de rata. Panel izquierdo: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -somatostatina-14 ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF-14) a membranas de estriado de rata por la SRIF fría. Las membranas (0,15 mg proteína/ml) se incuban durante 60 min a 30°C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF y de concentraciones crecientes de péptido frío. Los puntos corresponden a ratas Lewis control (■ n = 5), control tratadas con EAP (■ n = 5), ratas con grado 3 de encefalomiélitis autoinmune experimental (EAE) y ratas con grado 3 de EAE tratadas con 300 mg/kg peso/día de PEA (■ n = 5). Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Panel derecho: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF a membranas de estriado de ratas Lewis control (■ n = 5), control tratadas con EAP (■ n = 5), ratas con grado 3 de EAE (■ n = 5) o ratas con grado 3 de EAE tratadas con 150 mg/kg peso/día de PEA (■ n = 5). Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas.

Para averiguar si el PEA ejerce un efecto directo sobre los receptores de SRIF, se incluyó el compuesto en el medio de incubación a una concentración de 100 mg/ml en el momento del ensayo de unión del $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF-14 con membranas de hipocampo o estriado de ratas control. La adición de PEA no ejerció ningún efecto sobre los receptores de SRIF en ninguna de las áreas cerebrales analizadas, en comparación con los valores obtenidos en ausencia de PEA (figura 38).

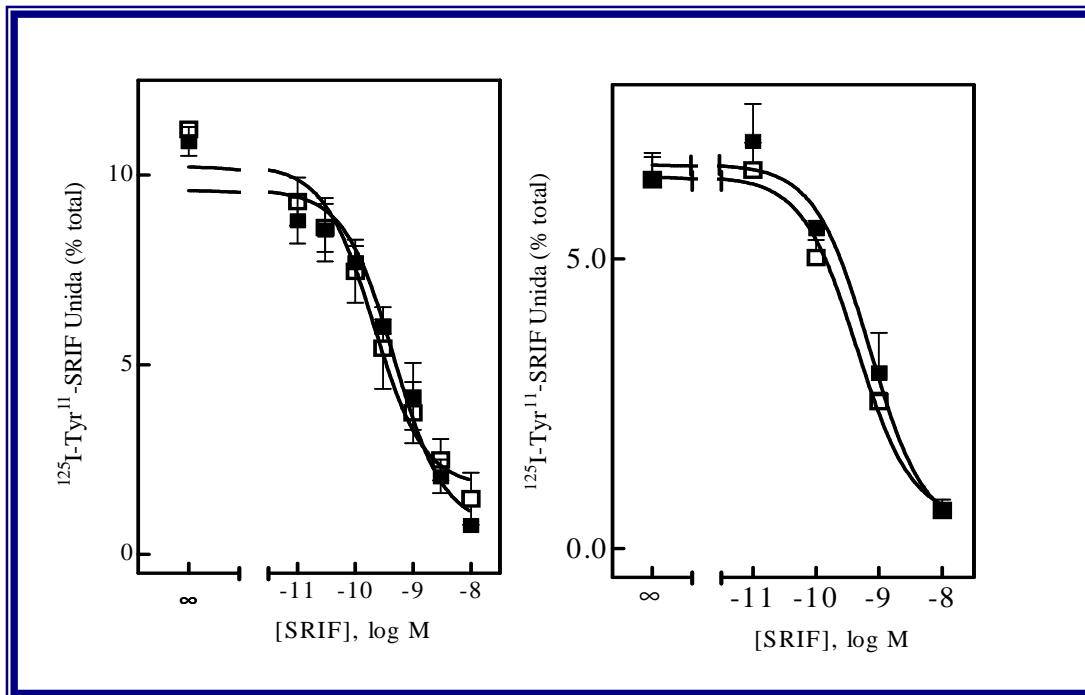


Figura 38. Panel izquierdo: inhibición competitiva de la unión de la $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -somatostatina-14 ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF-14) a membranas de hipocampo de rata por somatostatina fría (SRIF) en presencia de 100 mg/ml de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfato de etanolamina. Las membranas (0,15 mg proteína/ml) se incuban durante 60 min. a 30 °C en presencia de 250 pM de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}$ -SRIF y de concentraciones crecientes de péptido frío. Los puntos corresponden a ratas controles incubadas en presencia de PEA (\square , n = 5) o ausencia del mismo (\blacksquare , n = 5). Los valores se expresan como la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Panel derecho: mismo experimento realizado en membranas de estriado.

Como se ha descrito previamente, la EAE aguda, en grado 3, induce una disminución notable y selectiva de la expresión del receptor de SRIF sst2, sin cambios en los niveles proteicos y de ARNm de los subtipos sst1, sst3 y sst4. En vista de estos resultados, y con el fin de averiguar si el tratamiento con PEA era capaz de prevenir dicha reducción, se midieron los niveles proteicos del subtipo sst2 mediante western blot en membranas de hipocampo y estriado de los distintos grupos experimentales. Los resultados obtenidos demuestran que la administración de PEA dos días antes de la inducción de la EAE y durante 15 días, simultáneamente a la inmunización con PBM, retornó los niveles proteicos del sst2 a los valores control (figura 39). Dicho tratamiento no modificó los niveles de los subtipos sst1, sst3 o sst4 (figura 40). Asimismo, la administración de PEA a ratas control no ejerció ningún efecto significativo sobre los niveles del sst2.

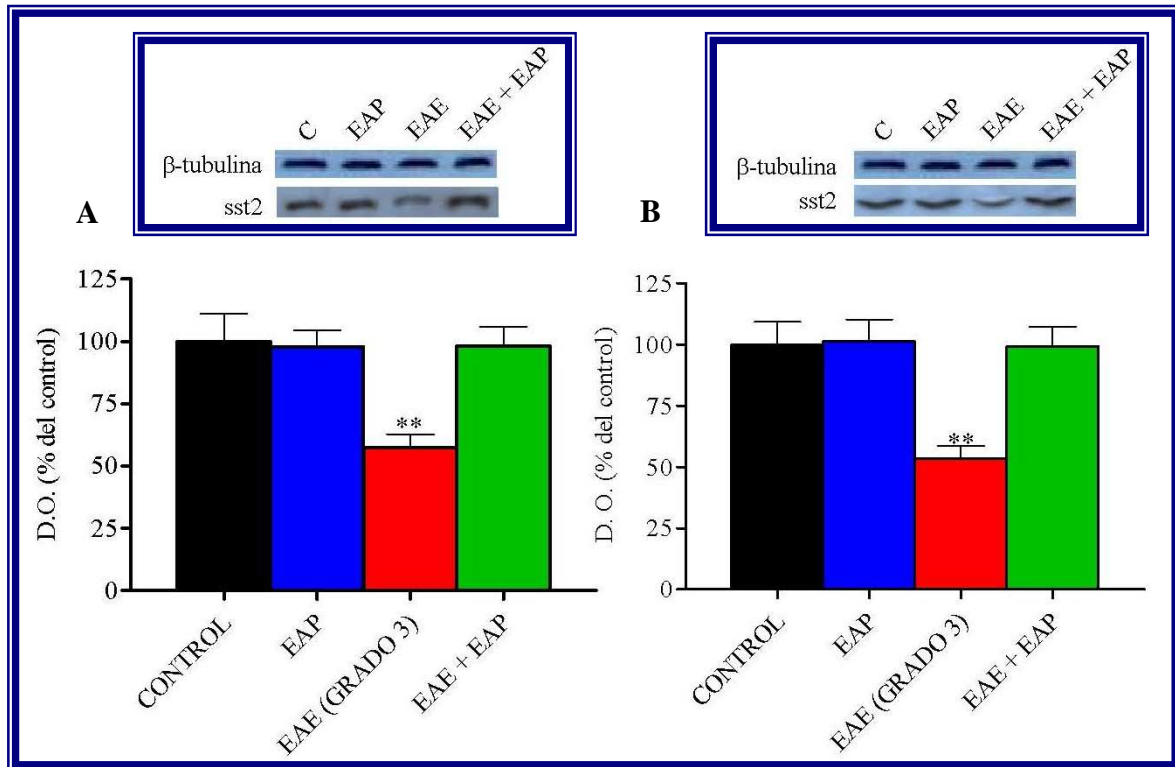


Figura 39. Efecto del tratamiento con PEA sobre los niveles proteicos del subtipo sst2 en hipocampo y estriado de rata. Panel superior: autorradiografías derivadas de la inmunodetección del subtipo sst2 en membranas de hipocampo (panel A) y estriado (panel B) de ratas control (C, n = 5), ratas tratadas con PEA (PEA, n = 5), ratas con EAE en grado 3 (EAE, n= 5), y ratas con EAE en grado 3 tratadas con PEA (EAE + PEA, n = 5). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos policlonales de cabra anti-sst1, anti-sst2, anti-sst3 o anti-sst4, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las figuras mostradas son representativas de otros cuatro ensayos. La β -tubulina se utilizó como control de carga. Panel inferior: análisis densitométrico de las autorradiografías derivadas de la inmunodetección del receptor sst2 en membranas de hipocampo (panel A) y estriado (panel B) de ratas control (barra negra), ratas tratadas con PEA (barra azul), ratas con EAE en grado 3 (barra roja), y ratas con EAE en grado 3 tratadas con PEA (barra verde). Se les asignó un valor arbitrario de 100 a las densidades ópticas de las bandas correspondientes al grupo control. La densidad óptica de las bandas correspondientes al grupo de ratas con EAE se representa como un porcentaje del control. Los datos representan la media \pm E. S. M. de cinco ratas. Comparación estadística frente al control: ** p < 0,01.

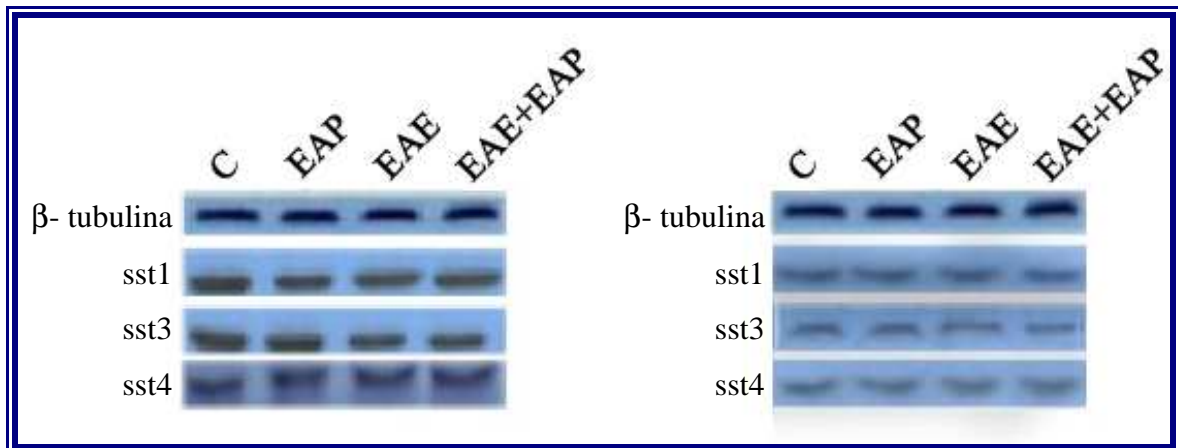


Figura 40. Efecto del tratamiento con PEA sobre los niveles proteicos de los subtipos sst1, sst3 y sst4 en hipocampo y estriado de rata. Autorradiografías derivadas de la inmunodetección del subtipo sst2 en membranas de hipocampo (panel izquierdo) y estriado (panel derecho) de ratas control (C, n = 5), ratas tratadas con PEA (PEA, n = 5), ratas con EAE en grado 3 (EAE, n= 5), y ratas con EAE en grado 3 tratadas con PEA (EAE + PEA, n = 5). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos policlonales de cabra anti-sst1, anti-sst2, anti-sst3 o anti-sst4, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las figuras mostradas son representativas de otros cuatro ensayos. La β -tubulina se utilizó como control de carga.

Para comprobar si la recuperación de los niveles proteicos del sst2 en ratas con EAE tratadas con la sal se correlacionan con una recuperación en la expresión del gen, se midieron los niveles de ARNm del sst2 por RT-PCR a tiempo real. El análisis de ΔC_T demuestra que tanto en el hipocampo como en el estriado de las ratas con EAE en grado 3 y tratadas con PEA, la tasa de transcripción del gen del sst2 se normaliza, alcanzando valores control (figura 41). Las muestras procedentes de ratas control tratadas con PEA, sin embargo, no mostraron cambios significativos en los niveles de ARNm del sst2.

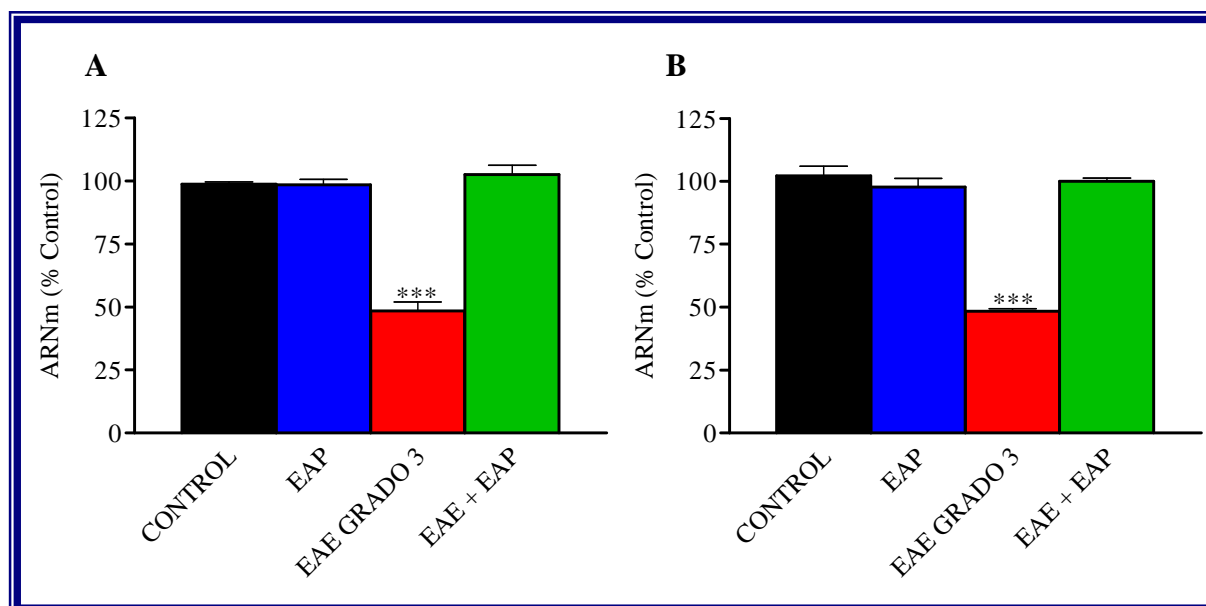


Figura 41. Contenido relativo del ARNm del receptor de somatostatina subtipo 2 (sst2) en el hipocampo (panel A) y el estriado (panel B) de ratas control (barra negra), ratas controles tratadas con PEA (barra azul), ratas con grado 3 de EAE (barra roja) y ratas con EAE tratadas con PEA (barra verde). Los valores se presentan como la media \pm E. S. M. de cinco experimentos por separado y realizados por duplicado. *** $p < 0,001$

Dado que el PEA ejerce una regulación a la alta en la transcripción del gen de sst2 se quiso determinar, a continuación, si dicho efecto era consecuencia de una alteración en los niveles del factor de transcripción CREB. Está bien establecido que en el promotor del gen sst2, existe un elemento de respuesta a AMPc (CRE), al que se une la proteína CREB fosforilada (p-CREB) para regular así la transcripción de dicho gen. Por ello se planteó la hipótesis de que un aumento en los niveles de ARNm del sst2 podría ser el resultado de un aumento en los niveles de p-CREB. Por consiguiente, se midieron los niveles proteicos de dicho factor en ratas control, ratas tratada con PEA, ratas con EAE en grado 3 y ratas con EAE tratadas con PEA (figura 42). Los ensayos de western blot demuestran que el PEA administrado tanto a ratas control como a ratas con EAE en grado 3 no modifica los niveles de p-CREB en comparación con los valores control.

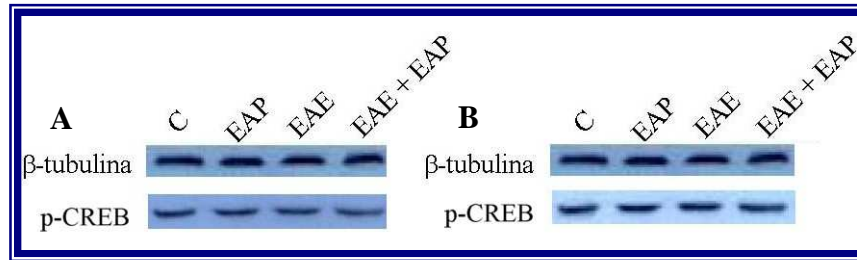


Figura 42. Autorradiografías procedentes de la inmunodetección de la forma fosforilada de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (p-CREB) en extractos tisulares procedentes de hipocampo (panel A) y estriado (panel B) de ratas Lewis control, ratas control tratadas con PEA, ratas con grado 3 de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda, y ratas con EAE tratadas con PEA. Las proteínas de las muestras se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos monoclonales de ratón anti-CREB-P. Cada experimento es representativo de otros cinco.

F. PAPEL DE LAS GRKS EN LA EAE

Puesto que las GRKs tienen un papel importante en la desensibilización y posterior internalización de los GPCR, se midieron los niveles proteicos de GRK2, GRK5 y GRK6, los isotipos más abundantes en cerebro, por western blot. Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos entre los distintos grupos experimentales analizados (figura 43).

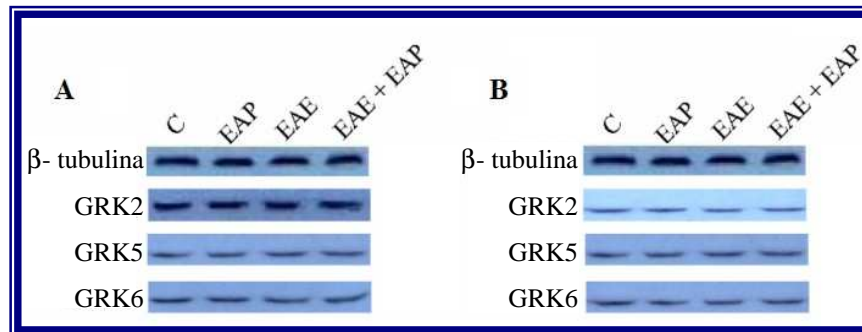


Figura 43. Autorradiografías procedentes de la inmunodetección de las isoformas 2, 5 y 6 de las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK2, GRK5 y GRK6) en membranas de hipocampo (panel A) y estriado (panel B) de ratas Lewis control (C), ratas tratadas con PEA (PEA), ratas con grado 3 de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y ratas con EAE tratadas con PEA (EAE + PEA). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos policlonales de cabra anti-GRK2, anti-GRK5 y anti-GRK6. Cada experimento es representativo de otros cinco.

G. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PEA SOBRE LA ACTIVIDAD AC

Previamente, se comprobó que la EAE induce una reducción en la capacidad de la somatostatina de inhibir la actividad AC basal y estimulada por forskolina. Por consiguiente, analizamos si el tratamiento de las ratas enfermas con la PEA podría

prevenir dicha reducción. Los resultados demuestran que el tratamiento con PEA normaliza la capacidad de la SRIF de inhibir la actividad de la AC, no detectándose cambios en la actividad enzimática (tablas 14 y 15). Tampoco se encontraron cambios en las veces de estimulación por FK de la actividad AC entre las ratas control, ratas tratadas con PEA, ratas con EAE en grado 3 y ratas con EAE tratadas con PEA.

Tabla 14. Actividad de la enzima adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg proteína) en presencia o ausencia de forskolina (FK) (10^{-5} M) o somatostatina (SRIF) (10^{-4} M) en membranas de hipocampo de ratas Lewis control (n = 5), ratas tratadas con PEA (n = 5), ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda en grado 3 (n = 5) y ratas con EAE tratadas con PEA (n = 5).

	CONTROL	PEA	EAE	EAE + PEA
Actividad				
Basal	161,5 ± 6,3	157,0 ± 26,2	156,7 ± 8,1	156,7 ± 2,1
+10⁻⁴ M SRIF	113,4 ± 6,9	111,1 ± 6,0	127,9 ± 3,9 *	112,5 ± 4,0
+10⁻⁵ M FK	352,1 ± 6,3	351,7 ± 12,5	357,6 ± 7,89	354,1 ± 6,7
+10⁻⁵ M FK + 10⁻⁴ M SRIF	232,0 ± 4,8	234,2 ± 7,4	279,2 ± 9,1 *	226,9 ± 6,6
Veces de estimulación	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,3
% Inhibición				
Basal	30,2 ± 1,2	29,4 ± 1,2	18,8 ± 1,0 **	34,5 ± 2,4
+10⁻⁵ M FK	33,8 ± 0,7	33,7 ± 0,6	21,9 ± 0,6 **	34,1 ± 0,7

Los valores representan la media ± E. S. M. de cinco experimentos individuales realizados por duplicado. Comparación estadística contra el control: * p < 0,05; ** p < 0,01.

Tabla 15. Actividad de la enzima adenilato ciclasa (pmol AMPc/min/mg proteína) en presencia o ausencia de forskolina (FK) (10^{-5} M) o somatostatina (SRIF) (10^{-4} M) en membranas de estriado de ratas Lewis control (n = 5), ratas tratadas con PEA (n = 5), ratas con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda en grado 3 (n = 5) y ratas con EAE tratadas con PEA (n = 5).

	CONTROL	PEA	EAE	EAE + PEA
Actividad				
Basal	350,0 ± 27,1	364,9 ± 69,6	358,9 ± 49,3	347,3 ± 41,8
+10⁻⁴ M SRIF	265,6 ± 32,5	272,9 ± 62,24	298,5 ± 27,7 **	260,6 ± 32,2
+10⁻⁵ M FK	552,1 ± 6,3	551,7 ± 14,5	551,7 ± 14,5	544,1 ± 10,7
+10⁻⁵ M FK + 10⁻⁴ M SRIF				
SRIF	336,4 ± 65,8	334,2 ± 90,4	426,0 ± 39,1 **	326,9 ± 76,6
% Inhibición				
Basal	24,1 ± 1,1	25,3 ± 2,0	18,8 ± 1,0 **	25,0 ± 1,2
+10⁻⁵ M FK	39,1 ± 2,7	39,4 ± 6,3	22,8 ± 5,5 **	39,9 ± 6,5

Los valores representan la media ± E. S. M. de cinco experimentos individuales realizados por duplicado. Comparación estadística contra el control: * p < 0,05; ** p < 0,01.

Puesto que los cinco receptores de somatostatina se acoplan a este efector a través de las proteínas Gi, se analizaron por western blot los niveles proteicos de las subunidades α_1 , α_2 y α_3 de las proteínas Gi en membranas de hipocampo y estriado de ratas control, ratas tratadas con PEA, ratas con EAE y ratas con EAE tratadas con PEA. Los resultados obtenidos demostraron que el PEA solo o administrado a ratas conjuntamente con la PBM, no modificó la cantidad de α_1 , α_2 o α_3 (figura 44).

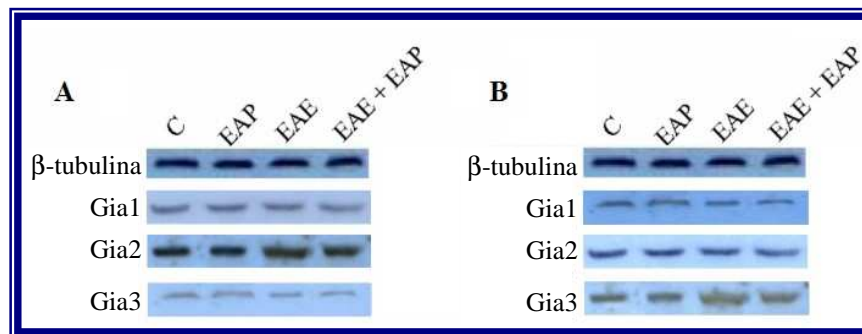


Figura 44. Autorradiografías procedentes de la inmunodetección de las subunidades α_1 , α_2 y α_3 de las proteínas G inhibidoras procedentes de corteza frontal, hipocampo y estriado de ratas control (C), ratas control tratadas con PEA (PEA), ratas con grado 3 de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) aguda y ratas con EAE aguda tratadas con fosfato de etanolamina (EAE + PEA). Las membranas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos monoclonales de ratón anti-Gi α_1 y anti-Gi α_2 y mediante el empleo del anticuerpo policlonal de ratón anti-Gi α_3 . Cada experimento es representativo de otros 5. Se empleó el anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina como control de carga.

Discusión

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos, el océano.
Sir Isaac Newton



La EAE aguda es una enfermedad autoinmune del SNC mediada por células T que reproduce muchos de los signos clínicos de la EM en humanos y, por consiguiente, se utiliza como modelo animal de la EM para valorar nuevas estrategias terapéuticas frente a esta enfermedad (Raine y Field, 1968; Steinman, 1999). La inmunización de ratas Lewis adultas con PBM induce una EAE monofásica aguda que se manifiesta con una debilidad ascendente progresiva, parálisis de las patas traseras y tetraplejía. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran, por primera vez, una alteración del sistema de neurotransmisión somatostatinérgica en el hipocampo y estriado de la rata Lewis con EAE aguda en grado 3, pero no en grado 1, así como un efecto protector de la sal de PEA. El efecto preventivo de dicha sal es dosis-dependiente, como revela la evaluación de los signos clínicos y los cambios en el peso corporal.

El modelo animal escogido para reproducir parcialmente la EM se basó en el modelo de Matsumoto y col. (1990). Todas las ratas a las que se inyectó el cóctel de PBM desarrollaron una EAE aguda que siguió un curso clínico similar al descrito por otros autores (Gold y col., 1997; Puerta y col., 2000). Diversos estudios han demostrado que la inmunización con PBM conlleva un aumento de la producción de anticuerpos anti-PBM que está implicado en el proceso de la EAE aguda (Raine y col., 1981; Day y col., 1986; Hashim y col., 1986; Hashim y Day, 1988; Karpus y Swanborg, 1991; Miller y Karpus, 1994; Rivero y col., 1997; Archelos y col., 2000). Se ha propuesto que dichos anticuerpos potencian la presentación de antígenos derivados de mielina por células presentadoras de antígeno (Myers y col., 1992). Por consiguiente, para validar nuestro modelo, medimos la concentración de anticuerpos anti-PBM en suero sanguíneo de ratas a las que se inyectó PBM. El aumento de la concentración sérica de auto-anticuerpos en dichas ratas, con respecto a los animales control, fue coherente con los resultados obtenidos por otros grupos (Stinissen y col., 1998; Rivero y col., 1999; Rostrom y col., 2004).

La pérdida de peso observada en las ratas con EAE aguda podría atribuirse tanto a una reducción en la ingesta de alimentos como a la inflamación. Un estudio reciente de Sanna y col. (2003) encontró un aumento en la expresión de leptina sérica que precede al inicio clínico de la EAE en ratones y que se correlaciona no sólo con la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad sino también con una reducción de la ingesta de alimento y del peso corporal. Se sabe que la leptina influye en la ingesta alimentaria, el metabolismo

basal, la inflamación y la inmunidad frente a patógenos infecciosos (Friedman y Halaas, 1998).

Para estudiar el efecto de la EAE aguda sobre el sistema somatostatinérgico y el posible efecto protector de la sal de PEA, se eligieron tres áreas cerebrales: la corteza frontal, por su implicación en procesos motores (Kolb, 1984); el hipocampo, por su implicación en procesos cognitivos (Meissner, 1966; Siggins y col., 1986; Cotman y Anderson., 1988); y el estriado por su implicación en ambos procesos (Di Chiara y col., 1981; Scheel-Kruger., 1984). Estas tres áreas cerebrales son, además, ricas tanto en neuronas somatostatinérgicas (Jöels y col., 1990; Garret y col., 1994) como en sst (Csaba y Dournaud, 2001) y está descrito que la SRIF modula dichas funciones motoras y cognitivas alteradas ambas en la EAE y EM. Aunque se han demostrado múltiples alteraciones en la sustancia blanca del sistema nervioso en la EM (Riechert y col., 1975; Davison y col., 1988; Waxman, 1992; Raine, 1994; Barkhof y van Walderveen., 1999), numerosos trabajos recientes han detectado también daños en la materia gris del SNC (Cercignani y col., 2001; De Stefano y col., 2003; Bruck, 2005; Cabranes y col., 2005; Cabranes y col., 2006; Zeis y col., 2008).

I. EFECTOS DE LA EAE AGUDA SOBRE EL SISTEMA SOMATOSTATINÉRGICO CEREBRAL DE LA RATA

A los 12 días de la inmunización de las ratas con PBM, se detectó un aumento notable de los niveles de IFN- γ y TNF- α en extractos de hipocampo y estriado. El análisis histológico del estriado de ratas con EAE aguda en grado 3 mostró una infiltración de células inflamatorias. En la EAE y en la EM, se ha descrito que los infiltrados inflamatorios se componen principalmente de linfocitos T y macrófagos, consideradas como las células efectoras más importantes del proceso (Raine, 1989; Heber-Katz, 1993; Wekerle, 1993). Por consiguiente, el aumento de IFN- γ y TNF- α detectado en nuestro estudio podría atribuirse a las citoquinas secretadas por dichas células. Estos hallazgos están en consonancia con estudios previos que muestran una elevación de varias citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α ,



en el LCR de pacientes de EM y animales con EAE (Baker y col., 1991; Navikas y Link, 1996).

El contenido de SRIF-IR en la corteza frontal, el hipocampo y el estriado de las ratas control fue similar al descrito previamente por nuestro grupo (Puebla y Arilla-Ferreiro, 2003; Izquierdo-Claros y col., 2004) y otros autores (Patel y Reichlin, 1978). En las ratas con EAE aguda en grado 1 o grado 3, no se encontraron cambios significativos en el contenido de SRIF-IR en ninguna de las tres áreas cerebrales analizadas en comparación con los animales control, lo que sugiere que los estímulos inflamatorios presentes en esta enfermedad no afectan a dicho parámetro. Estos resultados concuerdan con los de varios grupos de investigación que han demostrado que las citoquinas anteriormente mencionadas no alteran ni la expresión del ARNm ni la secreción aguda de la SRIF (Honneger y col., 1991).

Por otra parte, se ha descrito una sobreactivación de los receptores de NMDA en la EAE y Hathway y col. (2001) demostraron que el NMDA provoca un aumento concentración-dependiente en los niveles extracelulares de SRIF en cerebro de rata. Por consiguiente, esto podría causar una depleción de SRIF-IR. No obstante, también se ha demostrado que la activación de los receptores de NMDA estimula la expresión de SRIF en neuronas hipotalámicas (Rage y col., 1994). Existe la posibilidad, por lo tanto, que una mayor liberación de SRIF podría compensarse con una mayor síntesis del péptido, lo que podría explicar nuestros resultados.

Uno de los principales hallazgos de este estudio es que la EAE aguda en grado 3 provoca una disminución de la unión de $^{125}\text{I-Tyr}^{11}\text{-SRIF-14}$ a sus receptores en membranas de estriado e hipocampo de la rata. Los valores estequiométricos obtenidos tras el análisis de Scatchard revelaron que esta menor unión se debe a una disminución en el número de receptores de SRIF. Este efecto es específico de área ya que no se detectaron cambios en este parámetro en la corteza frontal de las ratas con dicha enfermedad. Los parámetros de unión de los receptores de SRIF en las tres áreas cerebrales de ratas control fueron similares a los descritos previamente por nuestro grupo y otros autores (Srikant y Patel, 1981; Epelbaum y col., 1982, Hervás-Aguilar y col., 2005). Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular implicado en dicha disminución, se analizó la expresión de los receptores sst1-sst4. Aunque se ha localizado sst5 en el cerebro de la rata, hay varios trabajos que demuestran que está presente en



niveles muy bajos y su expresión parece limitarse a regiones más rostrales del cerebro (Stroh y col., 1999). Los resultados obtenidos revelaron una disminución selectiva de los niveles proteicos de *sst2*, tanto en estriado como en hipocampo de ratas con EAE aguda en grado 3, sin cambios en ninguno de los subtipos en la corteza frontal, lo que concuerda con los datos de unión. El análisis por RT-PCR a tiempo real nos permite afirmar que esta reducción selectiva en el contenido proteico de *sst2* es, al menos en parte, consecuencia directa de una reducción en la expresión del gen de *sst2*, dado que los niveles de ARNm del receptor fueron significativamente menores en estas dos áreas cerebrales de las ratas con EAE en comparación con las ratas control. El análisis de la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa permitió descartar la posibilidad de que la disminución fuese consecuencia de una degradación del ARNm.

Como se ha descrito anteriormente, la EAE aguda en grado 3 indujo un aumento significativo de los niveles de TNF- α e IFN- γ en el hipocampo y estriado de la rata Lewis. En células endoteliales coronarias humanas, Yan y col. (2005) observaron que el tratamiento con TNF- α reduce tanto los niveles del ARNm de *sst2* como su inmunoreactividad. Por consiguiente, la disminución de *sst2* en hipocampo y estriado de ratas con EAE aguda podría estar inducido al menos en parte por el TNF- α liberado de las células endoteliales, macrófagos, etc. durante la enfermedad.

Dado que el número de receptores presentes en la superficie celular está en función de los procesos combinados de inserción de receptores recién sintetizados en la membrana plasmática y de internación de los mismos, la menor unión de la SRIF a sus receptores podría también deberse, en parte, a una alteración en la maquinaria de desensibilización o internación de los mismos. Las GRK desempeñan un papel importante en iniciar este proceso al fosforilar el receptor (Hipkin y col., 1997; Erdtmann-Vourliotis y col., 2001; Oomen y col., 2001; Gainetdinov y col., 2004; Kelly y col., 2008). Así, la fosforilación de un GPCR por GRK, seguido de la unión de arrestinas, previene eficazmente el acoplamiento posterior del receptor a su proteína G. Finalmente, el sistema GRK-arrestina promueve la internación, mediada por clatrina, de los receptores inactivados hacia endosomas para su posterior degradación o resensibilización. De las siete isoformas que conforman la familia de GRK, se han descrito altos niveles de expresión de GRK2 y GRK6 en el sistema inmune y en el cerebro (Erdtmann-Vourliotis y col., 2001) mientras que GRK5 es especialmente abundante en la región límbica del



cerebro. Vroon y col. (2003) demostraron recientemente que la inducción de la EAE mediante MOG conduce a un descenso pronunciado del contenido proteico de GRK2 y GRK6 en células de bazo. Asimismo, describieron una reducción similar de GRK2 en leucocitos de pacientes con EM remitente-recurrente o con EM progresiva secundaria (Vroon y col., 2005). Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ pueden disminuir los niveles proteicos de GRK2 (Lombardi y col., 1999; Ramos-Ruiz y col., 2000; Lombardi y col., 2002). Estas evidencias, junto con el aumento de TNF- α e IFN- γ detectado en nuestro estudio, nos llevó a pensar en una posible alteración a nivel de las GRK en estriado y/o hipocampo de ratas con EAE. Sin embargo, en el presente estudio los niveles de las isoformas GRK2, GRK5 o GRK6 en estriado e hipocampo de ratas con EAE aguda en grado 3 no cambian significativamente con respecto al grupo control, lo que sugiere a primera vista que estas quinasas no están implicadas en la regulación a la baja de sst2. No obstante, a partir de nuestros resultados, no se puede descartar la posibilidad de que la EAE en grado 3 haya provocado un cambio en la actividad de las GRK. Se ha demostrado que la GRK2 es un sustrato de la PKC (Penn y col., 2000). Hay evidencias de un aumento de la actividad PKC en la EAE (Vladimirova y col., 1999; Defazio y col., 2000). La PKC activa la GRK2, potenciando su traslado desde el citosol a la membrana plasmática (Winstel y col., 1996; Fardoun y col., 2007). Por consiguiente, una mayor actividad PKC en esta enfermedad contribuiría a una mayor activación de GRK2 y, por ende, a una mayor tasa de internación de los sst, puesto que la internación del receptor sst2A es dependiente de la fosforilación mediada por GRK2 (Tulipano y col., 2004). Diversos autores han observado un paralelismo entre la densidad de receptores de membrana y la actividad de GRK2. Ansonoff y col. (2001), por ejemplo, demostraron que el tratamiento de ratas hembra con estradiol induce una regulación a la baja de los receptores α -adrenérgicos que se asocia con una reducción concomitante en la actividad de esta quinasa. En otro estudio, se observó que la adicción a opiáceos en humanos se asocia con una regulación a la baja de los receptores μ -opiáceos, de GRK2 y GRK6 y de β -arrestina-2 (Ferrer-Alcón y col., 2004). Serán necesarios estudios adicionales para valorar dicha posibilidad.

Diversos estudios han descrito efectos moduladores de la PKC sobre la unión de la SRIF a sus receptores y sobre la señalización somatostatinérgica. Se ha demostrado que el tratamiento con activadores de la PKC, tales como ésteres de forbol, disminuye la



densidad de los sst en diferentes líneas celulares (Osborne y Tashjian, 1982; Zeggari y col., 1985; Matozaki y col., 1986; Felley y col., 1994). En otros estudios, se ha descrito que la activación de la PKC disminuye la unión de la SRIF a sus receptores (Schonbrunn y Tashjian, 1980; Felley y col., 1994) y que la exposición aguda a 12-miristoil-13-acetato de forbol atenúa la inhibición de la AC mediada por la SRIF (Katada y col., 1985; Gordeladze y col., 1989). Además, Hipkin y col. (2000) han demostrado que la activación de la PKC estimula la fosforilación e internación del receptor sst2A.

El gen de sst2 posee un elemento de respuesta a AMPc (CRE) en su región promotora (Kimura y col., 2001) que es un sitio de unión para el factor de transcripción CREB. La proteína CREB se activa al fosforilarse mediante la PKA en respuesta a una elevación en los niveles de AMPc. Montminy y col. (1990) demostraron que p-CREB estimula la transcripción basal de genes que contienen CRE y media la inducción de la transcripción. Por ello, un descenso en los niveles de p-CREB podría, en teoría, ser responsable de la reducción de la expresión de sst2 inducida por EAE. Sin embargo, la ausencia de cambios en los niveles de p-CREB entre las ratas control y las ratas con EAE aguda sugiere que la disminución del número sst2 está probablemente mediada por una ruta independiente de CREB/AMPc. Un estudio en células granulares de cerebelo de rata demostró una reducción en los niveles de ARNm de sst2 que era independiente de la vía del AMPc/CREB y dependiente de la calcineurina, una proteína fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (Kramer y col., 2005). Aunque no hemos analizado la actividad de la calcineurina en hipocampo o estriado de ratas con EAE aguda, se sabe que esta fosfatasa se expresa de forma abundante en el SNC (Polli y col., 1991). Recientemente, se ha descrito un aumento de la actividad de la calcineurina en la médula espinal durante la EAE aguda (Das y col., 2008). Es tentador especular, por lo tanto, que podría existir un nexo de unión entre esta enzima y la disminución del número sst2 que observamos en hipocampo y estriado de las ratas con EAE aguda en grado 3, aunque serán necesarios estudios en esta dirección para esclarecer esta posibilidad.

Hay evidencias que apuntan a un papel del estrés oxidativo en el desarrollo y progresión de la EM y la EAE (Espejo y col., 2005). Se ha demostrado la presencia de moléculas altamente reactivas, como el peroxinitrito, en las zonas de las lesiones (van der Veen y col., 1997) en fases muy tempranas de la EAE. Asimismo, la inyección de un agente neutralizante de peroxinitrito reduce la gravedad de los signos clínicos (Cross y



col., 2000). Por otro lado, este metabolito inhibe la proliferación de los oligodendrocitos mediante la activación microglial, evitando la remielinización en las regiones lesionadas (Bernardo y col., 2003; Li y col., 2005). El SNC es especialmente susceptible a los radicales libres debido a la elevada cantidad de oxígeno que utiliza, a las bajas concentraciones de enzimas antioxidantes y a las elevadas concentraciones de metales de transición redox-activos capaces de contribuir a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Sayre y col., 2008). Diversos trabajos han implicado al estrés oxidativo en alteraciones de determinadas moléculas de señalización celular. En este sentido, Li y col. (2008) demostraron que la reducción en los niveles de las proteínas $G_{i\alpha}$ y en la actividad AC inducida por altos niveles de glucosa en células musculares lisas vasculares podría atribuirse a un aumento de estrés oxidativo provocado por niveles altos de peroxinitrito. En otro estudio, con ratas Zucker obesas, se relacionó el aumento de estrés oxidativo con un aumento de la actividad PKC y del traslado a la membrana de GRK2 que resultó en una hiperfosforilación de los receptores dopaminérgicos D1 y su desacoplamiento de las proteínas G (Lappas y col., 2005). No podemos descartar, por lo tanto, un papel del estrés oxidativo en la reducción de sst2.

En base a los hallazgos obtenidos a nivel de los sst, el siguiente objetivo fue analizar la funcionalidad de dichos receptores en la EAE a través del estudio del efector AC. La actividad AC basal y estimulada por FK fue inhibida por la SRIF en todos los grupos experimentales analizados. La EAE en grado 3, sin embargo, provocó una reducción en la capacidad de la SRIF de inhibir dicha actividad. Se puede descartar la posibilidad de que este efecto se deba a un descenso en la funcionalidad de la subunidad catalítica de la AC, ya que la actividad de la AC estimulada por FK permaneció inalterada. La EAE aguda tampoco alteró la cantidad de $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$ o $G_{i\alpha 3}$, que son las responsables del acoplamiento de los sst a la AC. Estos hallazgos implican que la atenuación en la capacidad de la SRIF de inhibir la AC en ratas con EAE no se debe a una reducción en la expresión de Gi sino que es probablemente una consecuencia directa de la disminución del número de sst2.

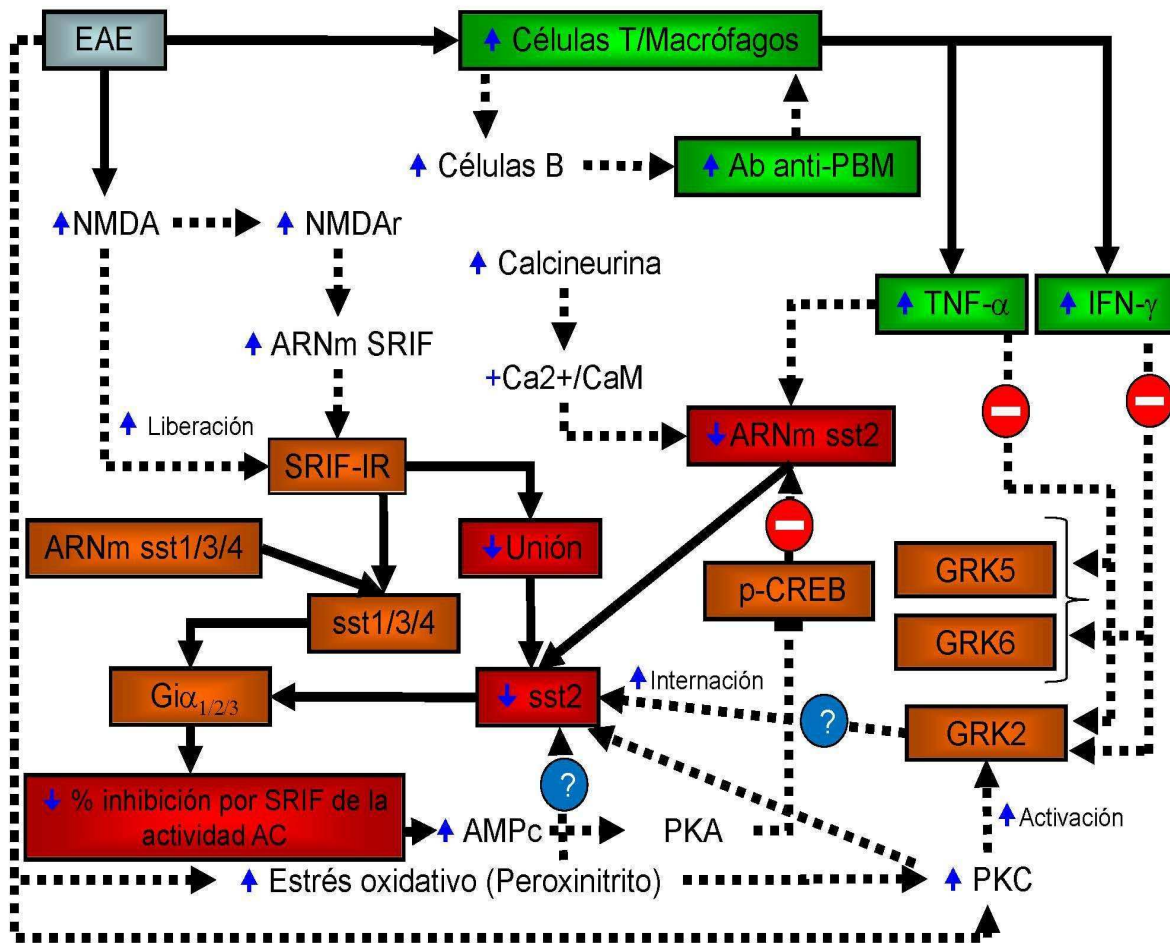




Figura 45: Resumen de las alteraciones provocadas por la EAE en el sistema somatostatinérgico cerebral. Los recuadros indican los parámetros medidos en este trabajo. En rojo se destacan los valores que disminuyen respecto al control, en naranja los que no varían y en verde los que aumentan. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. El símbolo  indica que esa vía no está implicada en el efecto. El símbolo  significa que dicha vía podría estar implicada en el efecto; Ab: anticuerpos; AC: adenilato ciclasa; CaM: calmodulina; EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental; GRK2: quinasa de los receptores acoplados a proteínas G subtipo 2; IFN-γ: interferón γ; NMDAr: receptor de NMDA; PBM: proteína básica de mielina; p-CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc fosforilada; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; SRIF-IR: somatostatina inmunorreactiva; sst: receptor de somatostatina; TNF-α: factor de necrosis tumoral α

El significado funcional de las alteraciones del sistema receptor-efector de la SRIF encontradas en la EAE aguda de grado 3 aún debe ser dilucidado. No obstante, resulta interesante el hecho de que sólo el receptor sst2, y no el sst1, sst3 o sst4, se encuentra alterado en la EAE aguda. De los 5 subtipos de receptores, el sst2 es el más abundante en el estriado de la rata (Dournaud y col., 1998), un área cerebral relacionada con la actividad motora, y numerosos estudios han relacionado el sst2 con la actividad motora y el aprendizaje espacial (Rezek y col., 1977; Vecsei y col., 1989; Salin y col., 1990; Viollet y col., 2000; Dutar y col., 2002; Tashev y col., 2004). En hipocampo, un



área relacionada con procesos cognitivos, el sst2 también es el subtipo predominante, con una expresión prominente en las regiones CA1 y CA2, especialmente en el estrato piramidal (Dournaud et al. 1996; Möller y col., 2003; Schindler et al. 1997; Viollet et al. 2000). Así, los hallazgos encontrados en este trabajo apoyan la idea de que la disminución de la actividad del sistema somatostatinérgico en el estriado e hipocampo de la rata durante la EAE aguda podría estar implicada en las alteraciones motoras y cognitivas descritas en la EAE por otros autores (Juhler, 1988; Heyser y col., 1997; Ziehn y col., 2010). En su conjunto, este estudio proporciona una nueva visión sobre la base molecular de la EAE que podría contribuir a una mejor comprensión de la EM en humanos.

II. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON LA SAL DE CALCIO, MAGNESIO Y POTASIO DE PEA

Varios tratamientos contra la EM representan un intento de reducir el riesgo de las recaídas y la progresión hacia una incapacidad sostenida. Sin embargo, muchas de estas terapias son sólo parcialmente efectivas y se asocian con efectos secundarios significativos y con una potencial toxicidad (Waubant, 2003; Fontoura y col., 2006). Además, no existe ningún tratamiento definitivo para bloquear el declive en la función y la acumulación de la incapacidad a lo largo de los años en los pacientes con EM. Por consiguiente, se están desarrollando terapias prometedoras dirigidas hacia la inmunosupresión, la inmunomodulación, el tráfico celular a través de la barrera hematoencefálica, la neuroprotección y la potenciación de la reparación del SNC (Waubant, 2003). En los años 60, el Dr. Nieper desarrolló un complejo de Ca-Mg-K-PEA que utilizó en el tratamiento de la EM en Alemania (Nieper y Kholer, 1962; Nieper, 1967; Nieper, 1968). En un estudio retrospectivo de los pacientes de EM del Dr. Nieper, el 82% de ellos mostraron una estabilización o una mejoría. Este estudio se publicó en un libro (Nieper, 1994), sin embargo, los artículos publicados acerca de la eficacia de este producto son meramente anecdóticos. Una búsqueda exhaustiva reveló que no existe ningún estudio animal ni clínico controlado sobre las propiedades de la sal de PEA. Recientemente se ha descrito que derivados de etanolamina, como la N-acil-etanolamina, tienen propiedades neuroprotectoras (Hansen y col., 2002). La mayoría de estos datos



derivan de estudios *in vitro* por lo que se requieren estudios adicionales *in vivo* para obtener evidencias más definitivas de un papel neuroprotector de estos derivados. En ratas Lewis con EAE, se ha demostrado una reducción en el porcentaje de fosfatidiletanolamina en el SNC (Pinto y col., 2003). Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, el estrés oxidativo parece jugar un papel clave en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Koprowski y col., 1993; Bo y col., 1994; Van der Goes y col., 1998). Dado que la etanolamina es un precursor de la fosfatidiletanolamina y posee tanto las acciones anti-inflamatorias como antioxidantes de los derivados de etanolamina, nos propusimos evaluar si la sal de calcio, magnesio y potasio de PEA podría prevenir la manifestación clínica de la EAE aguda y proteger a las ratas inmunizadas con PBM de las alteraciones del sistema somatostatinérgico anteriormente descritas.

Marshall y col. (1996) demostraron que la administración de etanolamina a ratas provoca un aumento dosis-dependiente de los niveles de la misma en plasma, LCR y cerebro, así como a un aumento de los niveles del fosfolípido fosfatidiletanolamina. Se sabe que las neuronas poseen una mayor afinidad para captar etanolamina que las células gliales (Massarelli y col., 1986). El PEA se utiliza como componente estructural en la síntesis *de novo* de fosfatidiletanolamina por la vía de Kennedy (Kennedy y Weiss, 1956). Dado que se ha demostrado que la incorporación de precursores lipídicos en lípidos totales del SNC es mayor en la fase aguda de la EAE que en los controles (Smith, 1964) y en vista de los efectos protectores que ejerce la PEA sobre las alteraciones del sistema somatostatinérgico en ratas con EAE encontrados en este estudio, es muy probable que la PEA administrada a los animales se incorpore rápidamente al SNC.

El presente estudio demuestra por primera vez que la administración de la sal de calcio, magnesio y potasio de PEA a las ratas previo al desarrollo de la EAE aguda y durante 12 días tras la inyección previene las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En la EAE está comprometida la permeabilidad de la BHE (Abilleira y col., 2003; Alvarez-Sabin y col., 2004).

La administración de PEA previno la elevación del título de anticuerpos anti-PBM que se detectó en el suero de ratas con EAE aguda. Recientemente, Vilcaes y col. (2005) demostraron que la presencia de moléculas de IgG que bloquean la reactividad de las IgG anti-PBM se correlaciona con el desarrollo de los signos clínicos de la EAE. Estos autores observaron que la capacidad de bloqueo de los sueros procedentes de animales



enfermos de EAE durante el estado agudo era menor que la de los sueros de animales sanos y de los animales que no desarrollaron una parálisis. Lyons y col. (2002) sugieren un papel importante de las células B en la patogenia de la EAE inducida con MOG recombinante por el papel crítico de los anticuerpos.

Se ha demostrado recientemente que la dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE) bloquea la activación de células T específicas de antígeno (Legler y col., 2001) y que la etanolamina aumenta la proliferación de células NK (Pierson y col., 1995). Estas células NK ejercen un efecto citotóxico directo sobre las células T encefalitogénicas específicas de antígenos de mielina (Xu y col., 2005). Por otro lado, algunos autores sugieren que existe una acción sinérgica entre las células B y T en la inducción de la EAE aguda (Myers y col., 1992; Willenborg y col., 1983). Por lo tanto, la administración de PEA podría provocar un aumento de los niveles de DPPE que inhibiría la proliferación de las células T, conduciendo así a una pérdida del efecto activador de estas células sobre las células B. Esto causaría un descenso en el título de anticuerpos anti-PBM y, con ello, una reducción en el efecto de dichos anticuerpos en el desarrollo de la EAE aguda.

Por otro lado, hay que destacar que la etanolamina forma parte de la anandamida, un cannabinoide endógeno que ejerce un efecto inmunorregulador sobre la proliferación de linfocitos T y B humanos inducida por mitógenos (Schwarz y col., 1994). Se ha descrito recientemente una disminución significativa de los niveles de anandamida en la EAE aguda (Cabranes y col., 2005). Por lo tanto, la administración de la PEA podría restablecer los niveles de anandamida, recuperándose así la capacidad de dicho cannabinoide para inhibir la proliferación de las células T y B. En este sentido, hay estudios que han demostrado una mejoría de la EAE aguda cuando se inhibe la activación de los linfocitos T con arvanil, una molécula híbrida entre capsaicina y anandamida (Malfitano y col., 2006).

La administración de PEA a las ratas antes de la inmunización con PBM y durante la misma bloqueó la elevación de los niveles de IFN- γ y TNF- α en el hipocampo y el estriado que se observó durante la EAE aguda. Este efecto preventivo se correlacionó con una mejoría de los signos clínicos de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con varios estudios que muestran que ambas citoquinas están asociadas a la fase clínica de la EAE (Jung y col., 1997; Bourrié y col., 1999). El IFN- γ estimula la producción de TNF- α por parte de los astrocitos, macrófagos y microglia *in vitro* (Frei y col., 1987; Merrill y



col., 1993; Stout y Suttles, 1993; Renno y col., 1995; Merrill y Benveniste, 1996) y, probablemente, *in vivo*, por lo que la reducción de los niveles del IFN- γ observada en este estudio podría estar directamente implicada en la reducción de los niveles de TNF- α obtenida en nuestros experimentos. En lo que respecta al IFN- γ , se han encontrado observaciones contradictorias a partir de estudios sobre esta citoquina en la EAE. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales anti- IFN- γ empeoraron la enfermedad en ratones (Billiau y col., 1988; Duong y col., 1994) y que la administración intraventricular de IFN- γ en ratas inhibe la EAE (Voorthuis y col., 1990). Sin embargo, en otro estudio, la administración directa de la citoquina en el SNC de la rata produjo inflamación (Simmons y Willenborg, 1990; Sethna y Lampson, 1991). Es más, el tratamiento con IFN- γ empeoró la EM (Panitch y col., 1987). Por lo tanto, la reducción de los niveles de IFN- γ en las ratas tratadas con PEA podría dar como resultado una expresión reducida de moléculas MHC-II, inhibiendo así la proliferación de linfocitos T, tal como se ha demostrado para la estatina (Kwak y col., 2000; Palinski, 2000), el copolímero 1 (Aharoni y col., 1999) y el IFN- β (Arnason y col., 1996).

Se sabe que el IFN- γ induce la expresión de antígenos MHC clase I en neuronas (Wong y col., 1984; Suzumura y Silberberg, 1985) y de MHC clase II y moléculas co-estimuladoras en la microglia, permitiendo que éstas funcionen como células presentadoras de antígenos para células T (Suzumura y col., 1987; Williams y col., 1994; Satoh y col., 1995; Menendez-Iglesias y col., 1997). Un estudio reciente ha mostrado que el ácido hialurónico asociado a PEA puede bloquear la expresión de MHC de clase I y II inducida por IFN- γ y la proliferación de células T inducidas por reacción de linfocitos mixtos y la secreción de citoquinas (Yard y col., 2002). En base a esto, podemos decir que la PEA podría estar influyendo en el proceso de presentación de antígenos a los linfocitos T, reduciendo su activación y, por tanto, también la gravedad y la incidencia de la enfermedad.

Además del papel de la PEA sobre los signos clínicos de la EAE, demostramos también que el tratamiento de las ratas inmunizadas con PBM con la sal de PEA previene la reducción tanto en la unión de SRIF a sus receptores como en la expresión del sst2. Como se ha comentado anteriormente, la disminución de sst2 observada en la EAE aguda podría atribuirse, al menos en parte, al aumento de la concentración de TNF- α detectado en el hipocampo y el estriado. Dado que este tratamiento bloquea el aumento en los



niveles de dicha citoquina, se puede concluir que el efecto preventivo de la PEA sobre las alteraciones del sistema somatostatinérgico de la rata se debe, en parte, a su actividad inmunosupresora. A su vez, el hecho de que la capacidad de SRIF de inhibir la actividad AC revirtió a los valores control en las ratas tratadas con la sal puede explicarse por la normalización de los receptores de SRIF.

Alternativamente, Kitajka y col. (2002) han descrito un papel de la fosfatidiletanolamina en la transducción de señales asociada a GPCRs, regulando la actividad y/o localización de determinadas proteínas de membrana tales como proteínas G, PKC, receptores α_2 -adrenérgicos y AC. Dado que la PEA es un precursor de la fosfatidiletanolamina, estos resultados también podrían explicar el papel protector de la PEA sobre el sistema somatostatinérgico en el hipocampo y estriado de las ratas inmunizadas con PBM.

Por otro lado, se ha demostrado que la fosfatidiletanolamina ejerce un papel estimulador sobre la síntesis de ARN al aumentar la actividad de la ARN polimerasa (Aizawa y Nishigori, 1967). Se sabe que en la EAE, hay una disminución en el porcentaje de dicho lípido (Smith, 1964). Por consiguiente, esta disminución podría contribuir a la reducción en los niveles de ARNm de sst2 y, por ende, en los niveles proteicos del mismo observado en nuestro estudio, dado que la atenuada expresión de sst2 se previene con el tratamiento con PEA.

Como se ha comentado previamente, el estrés oxidativo podría ser clave en el desarrollo de la EAE. Hay evidencias que sugieren que la fosfatidiletanolamina podría proteger contra el estrés oxidativo en el cerebro de la rata, reduciendo la peroxidación lipídica (Kuczynski y Reo, 2006). Además, se ha demostrado que plasmalógenos de etanolamina también reducen la oxidación de membranas (Maeba y Ueta, 2003a, b; Maeba y Ueta, 2004) y poseen efectos antiinflamatorios (Schremmer y col., 1979). Por consiguiente, el efecto de la sal de PEA en la prevención de tanto la manifestación clínica de la EAE aguda como la reducción del sst2 podría relacionarse con un papel antioxidante de dicha sal.

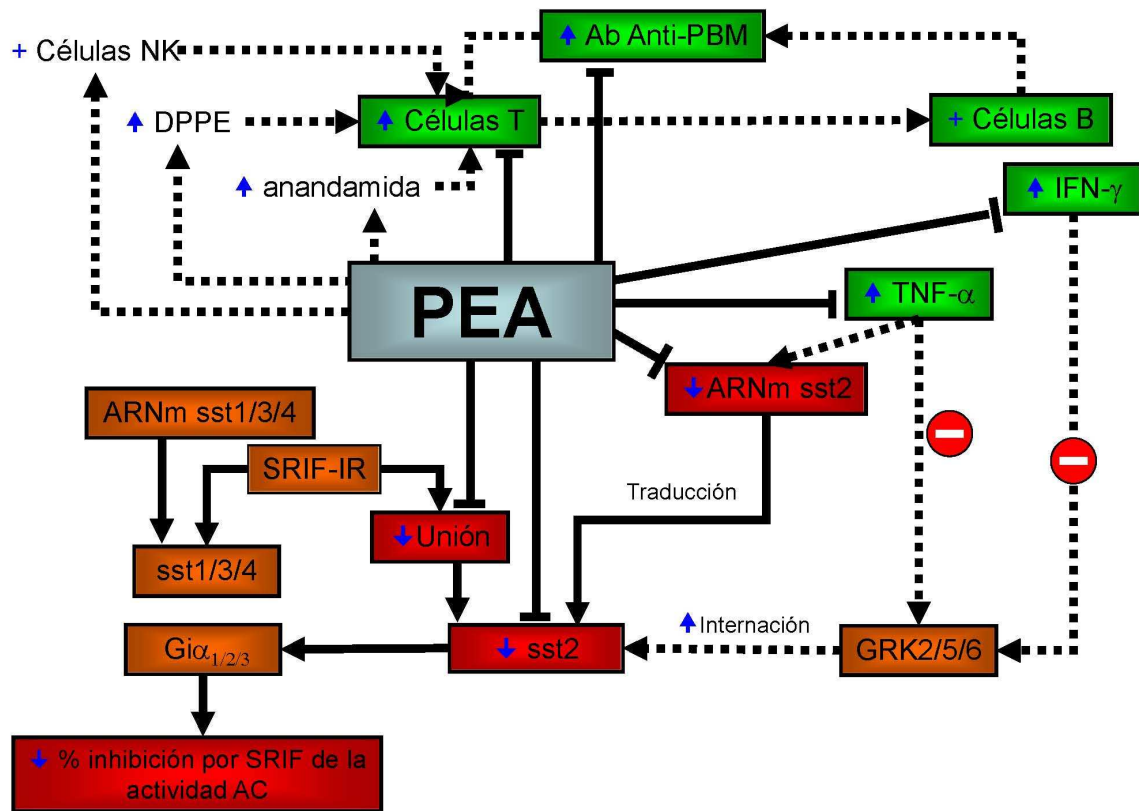


Figura 46: Resumen de los efectos de la PEA sobre las alteraciones provocadas por la EAE en el sistema somatostatínico cerebral. Los recuadros indican los parámetros medidos en este trabajo. En rojo se destacan los valores que disminuyen respecto al control, en naranja los que no varían y en verde los que aumentan. Las flechas sólidas indican los efectos estudiados en este trabajo y las flechas discontinuas indican los efectos analizados por otros autores. Las cabezas de flecha truncadas indican los efectos abolidos por el tratamiento con PEA. El símbolo \ominus indica que esa vía no está implicada en el efecto; Ab: anticuerpos; AC: adenilato ciclasa; CaM: calmodulina; EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental; GRK2: quinasa de los receptores acoplados a proteínas G subtipo 2; IFN- γ : interferón γ ; NMDAr: receptor de NMDA; PBM: proteína básica de mielina; p-CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc fosforilada; PEA: fosfato de etanolamina; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; SRIF-IR: somatostatina inmunorreactiva; sst: receptor de somatostatina; TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

El conjunto de estos resultados demuestra que la administración de una sal de PEA, que actualmente está presente como aditivo alimentario, previene las manifestaciones clínicas y los signos histopatológicos de la EAE aguda, con un papel destacable sobre los anticuerpos anti-MBP y sobre los niveles de IFN- γ y TNF- α . Además, previene las alteraciones de la neurotransmisión somatostatínica en hipocampo y estriado de la rata, lo que sugiere que la PEA podría ser un agente preventivo prometedor en el tratamiento de la EM.

Conclusiones

El miedo hiera más que las espadas.
Arya Stark.



1. La encefalomiелitis autoinmune experimental aguda en la rata Lewis cursa con una disminuci3n del n3mero de receptores de somatostatina en membranas de hipocampo y estriado. Esta disminuci3n del n3mero total de receptores de somatostatina se debe, al menos en parte, a una disminuci3n en la expresi3n del ARNm del subtipo 2 del receptor de somatostatina.
2. Asimismo, en dicha enfermedad se detectan anticuerpos frente a la prote3na b3sica de mielina en suero y aumentan los niveles del factor de necrosis tumoral alfa e interfer3n gamma en ambas 3reas cerebrales. Dado que se ha descrito que el factor de necrosis tumoral alfa disminuye el n3mero de receptores de somatostatina, es posible que el aumento de los niveles tisulares de dicha citoquina pueda, al menos en parte, ser el causante de la disminuci3n del n3mero de receptores de somatostatina tipo 2 encontrado en el presente estudio.
3. La encefalomiелitis autoinmune experimental aguda no altera la actividad adenilato ciclasa basal ni la estimulada por forskolina ni tampoco modifica los niveles de prote3nas Gi. Por lo tanto, la disminuci3n del efecto inhibitor de la somatostatina sobre la actividad adenilato ciclasa encontrada en membranas de hipocampo y estriado de rata con encefalomiелitis autoinmune experimental aguda se puede deber, al menos en parte, a una disminuci3n del n3mero de receptores de somatostatina tipo 2 hallada en estas membranas.
4. El hecho de que en la encefalomiелitis autoinmune experimental aguda de la rata no se modifiquen los niveles de las quinasas de receptores acoplados a prote3nas G (subtipos GRK2, GRK5 y GRK6), nos sugiere que dichas quinasas no est3n implicadas en la disminuci3n del n3mero de receptores de somatostatina tipo 2 encontrado en el presente estudio.



5. Dada la implicación del sistema receptor-efector de la somatostatina y del hipocampo y del estriado en los procesos cognitivos y motores, la disminución de la actividad de dicho sistema podría estar implicada, al menos en parte, en el déficit de ambas funciones en los animales con encefalomiелitis autoinmune experimental aguda.
6. La administración de la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfato de etanolamina dos días antes de inducir la encefalomiелitis autoinmune experimental aguda previno la aparición de los signos clínicos e histopatológicos de esta enfermedad así como las alteraciones del sistema receptor-efector de la somatostatina en hipocampo y estriado de la rata. Asimismo, dicha sal previno la aparición de anticuerpos frente a la proteína básica de mielina y la elevación de los niveles del factor de necrosis tumoral alfa e interferón gamma en los animales que habían sido inyectados con proteína básica de mielina. Estos resultados nos sugieren que la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfato de etanolamina tiene actividad inmunosupresora en estos animales.
7. El hecho de que la sal de calcio, magnesio y potasio de fosfato de etanolamina pueda interferir eficazmente con la reacción autoinmune asociada a la encefalomiелitis autoinmune experimental aguda apoya la realización de estudios adicionales sobre el uso de la sal como una terapia potencial para la esclerosis múltiple.

Artículos publicados



ARTÍCULOS PUBLICADOS

El trabajo presentado ha dado lugar a las siguientes publicaciones internacionales:

- Aguado-Llera D, Puebla-Jiménez L, Arilla-Ferreiro E. Alteration of the somatostatinergic system in the striatum of rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neuroscience**. 2007;148:238-249.
- Aguado-Llera D, Puebla-Jiménez L, Barrios V, Hernández-Pinto A, Arilla-Ferreiro E. Role of ethanolamine phosphate in the hippocampus of rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neurochem. Int.** 2011;58:22-34.
- Aguado-Llera D, Puebla-Jiménez L, Bodega-Magro G, Arilla-Ferreiro E. Calcium, Magnesium and Potassium ethanolamine phosphate prevents clinical expression of acute experimental autoimmune encephalomyelitis and alterations at the somatostatinergic system associated to the disease in the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**. 2011 (Enviado).

Aparte de estas publicaciones, se han conseguido los siguientes artículos adicionales en revistas internacionales:

- Aguado-Llera D, Martín-Martínez M, García-López MT, Arilla-Ferreiro E, Barrios V. Gly-Pro-Glu protects beta-amyloid-induced somatostatin depletion in the rat cortex. **Neuroreport**. 2004; 15(12):1979-1982.
- Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E, Campos-Barros A, Puebla-Jiménez L, Barrios V. Protective effects of insulin-like growth factor-I on the somatostatinergic system in the temporal cortex of beta-amyloid-treated rats. **Journal of Neurochemistry**. 2005;92(3):607-615.
- Hervás-Aguilar A, Puebla-Jiménez L, Burgos-Ramos E, Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E. Effects of single and continuous administration of amyloid beta-peptide (25-35) on adenylyl cyclase activity and the

somatostatinergic system in the rat frontal and parietal cortex. **Neuroscience**. 2005;135(1):181-190.

- Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E, Chowen JA, Argente J, Puebla-Jiménez L, Frago LM, Barrios V. 17beta-Estradiol protects depletion of rat temporal cortex somatostatinergic system by beta-amyloid. **Neurobiology of Aging**. 2007;28:1396-1409.
- Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E, Barrios V. Neuroprotective effects of insulin-like growth factor I against neurotoxic amyloid. **Cognitive Sciences**. 2007;2:13-29.
- Burgos-Ramos E, Hervás-Aguilar A, Aguado-Llera D, Puebla-Jiménez L, Hernández-Pinto AM, Barrios V, Arilla-Ferreiro E. Somatostatin and Alzheimer's disease. **Mol. Cell Endocrinol**. 2008;286:104-111.
- Barcia C, Ros F, Carrillo MA, Aguado-Llera D, Ros CM, Gómez A, Nombela C, de Pablos V, Fernández-Villalba E, Herrero MT. Inflammatory response in Parkinsonism. **J. Neural Transm. Suppl**. 2009;73:245-252.
- Burgos-Ramos E, Martos-Moreno GA, López MG, Herranz R, Aguado-Llera D, Egea J, Frechilla D, Cenarruzabeitia E, León R, Arilla-Ferrero E, Argente J, Barrios V. The N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-I protects against beta-amyloid-induced somatostatin depletion by calcium, and glycogen synthase kinase 3 beta modulation. **J. Neurochem**. 2009;109:360-370.
- Traverso JA, López-Jaramillo FJ, Serrato AJ, Ortega-Muñoz M, Aguado-Llera D, Sahrawy M, Santoyo-gonzales F, Neira JL, Chueca A. Evidence of non-functional redundancy between two pea h-type thioredoxins by specificity and stability studies. **J. Plant Physiol**. 2010;467:423-429.
- Aguado-Llera D, Goormaghtigh E, de Geest N, Quan XJ, Prieto A, Hassan BA, Gómez J, Neira JL. The basic helix-loop-helix región of human neurogenin 1 is a monomeric natively unfolded protein which forms a "fuzzy" complex upon DNA binding. **Biochemistry** 2010;49:1577-1589.



- Aguado-Llera D, Oyenarte I, Martínez-Cruz LA, Neira JL. The CBS domain of MJ0729 of *Methanocaldococcus jannaschii* binds DNA. **FEBS Lett.** 2010;584:4485-4489.
- Martínez-Cruz LA, Encinar JA, Sevilla P, Oyenarte I, Gómez-García I, Aguado-Llera D, García-Blanco F, Gómez J, Neira JL. Nucleotide-induced conformational transitions in the CBS domain protein MJ0729 of *Methanocaldococcus jannaschii*. **Protein Eng. Des. Sel.** 2011;24:161-169.
- Aguado-Llera D, Martínez-Gómez AI, Prieto J, Marenchino M, Traverso JA, Gómez J, Chueca A, Neira JL. The conformational stability and biophysical properties of the eukaryotic thioredoxins of *pisum sativum* are not family-conserved. **PLoS One** 2011;6:e17068.

Bibliografía

El hombre nada puede aprender sino en virtud de lo que sabe.
Aristóteles.



- Abilleira S, Montaner J, Molina C, Monasterio J, Castillo J, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. **J. Neurosurg.** 2003; 99: 65-70.
- Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmermann L, Wraith DC, Tausch GS, Waldor MK, Zamvil SS, McDevitt HO, Steinmann L. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. **Cell.** 1988;54(2):263-273.
- Agro A, Padol I, Stanisiz AM. Immunomodulatory activities of the somatostatin analogue BIM 23014c: effects on murine lymphocyte proliferation and natural killer activity. **Regul. Pept.** 1991;32:129-139.
- Agro A, Stanisiz AM. Neuroimmunomodulation: classical and non-classical cellular activation. **Adv. Neuroimmunol.** 1995:311-319.
- Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E, Campos-Barros A, Puebla-Jimenez L, Barrios V. Protective effects of insulin-like growth factor-I on the somatostatinergic system in the temporal cortex of beta-amyloid-treated rats. **J. Neurochem.** 2005;92(3):607-15.
- Aguilar MC, Dees WL, Haensly WE, McCann SM. Evidence that somatostatin is localized and synthesized in lymphoid organs. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991;88:11485-11489.
- Aguilar MC, Rodríguez AM, Aguila-Mansilla HM, Lee WT. Somatostatin antisense oligodeoxynucleotide-mediated stimulation of lymphocyte proliferation in culture. **Endocrinology** 1996;137:1590.
- Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 1999;96:634-639.
- Ahmed AA, Wahbi A, Nordlind K, Kharazimi A, Sundqvist KG, Mutt V, Liden S. In vitro Leishmania major promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides. **Scand. J. Immunol.** 1998;48:79.
- Aizawa Y, Nishigori H. Effect of phosphatidylethanolamine on RNA polymerase in the rat uterine nucleus. **Jpn. J. Pharmacol.** 1967;17(4):686-687.
- Albini A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A, Thellung S, Cai T, Noonan DM, Schettini G. Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. **FASEB J.** 1999;13:647-655.
- Alderton F, Fan TP, Humphrey PP. Somatostatin receptor-mediated arachidonic acid mobilization: evidence for partial agonism of synthetic peptides. **Br. J. Pharmacol.** 2001;132(3):760-766.
- Aloe L, Micera A. A role of nerve growth factor in oligodendrocyte growth and differentiation of EAE affected rats. **Arch. Ital. Biol.** 1998;136(4):247-256.
- Alvarez-Sabin J, Delgado P, Abilleira S, Molina C, Arenillas J, Ribo M, Santamarina E, Quintana M, Monasterio J, Montaner J. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. **Stroke.** 2004;35: 1316-1322.
- Althaus HH, Klöppner S, Schmidt-Schultz T, Schwartz P. Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. **Neurosci. Lett.** 1992;135(2):219-223.

- Ansonoff MA, Etgen AM. Estrogen increases G protein coupled receptor kinase 2 in the cortex of female rats. **Brain Res.** 2001;898(1):186-189.
- Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.** 2000;47(6):694-706.
- Arevalo-Martin A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C. Therapeutic actino of cannabinoids in a murine model of múltiple sclerosis. **J. Neurosci.** 2003;23:2511-2516.
- Arimura A, Sato H, Dupont A, Nishi N, Schally AV. Somatostatin: abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. **Science.** 1975;189:1007-1009.
- Arnason BG, Dayal A, Qu ZX, Jensen MA, Genc K, Reder, AT. Mechanisms of action of interferon-beta in multiple sclerosis. **Springer Semin. Immunopathol.** 1996;18:25-148.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JPY. TNF α promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. **Nat. Neurosci.** 2001;4:1116-1122.
- Atiya A, Malik M, Une S, Shevlin L, Coy D, Brunicardi FC. Immunomodulatory activities of the somatostatin receptor subtype analogues on human peripheral blood lymphocytes. **Transpl. Proc.** 1997;29:215.
- Auchampach JA. Adenosine receptors and angiogenesis. **Circ. Res.** 2007;101(11):1075-1077.
- Augoog SJ, Kiyama H, Faull RLM, Emson PC. Dopaminergic D1 and D2 receptor antagonists decrease prosomatostatin mRNA expression in rat striatum. **Neuroscience** 1991;44:35-44.
- Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CC, De Menezes SL. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. **Free Radic. Biol. Med.** 2002; 32: 841-859.
- Baek KJ, Das T, Gray C, Antar S, Murugesan M, Im MJ. Evidence that the Gh protein is a signal mediator from alpha 1-adrenoceptor-coupled Gh family and purification of Gh7 from bovine heart. **J. Biol. Chem.** 1993;268:27390-27397.
- Baetens D, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Orci L. Endocrine pancreas: three dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans. **Science** 1979;206:1323-1325.
- Baker D, O'Neill JK, Turk JL. Cytokines in the central nervous system of mice during chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. **Cell Immunol.** 1991;134(2):505-510.
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. **Nature** 2000;404:84-87.
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V. Endocannabinoids control spasticity in experimental multiple sclerosis. **FASEB J.** 2001;15:300-302.
- Barber DL, Ganz MB, Bongiorno PB, Strader CD. Mutant constructs of the beta-adrenergic receptor that are uncoupled from adenylyl cyclase retain functional activation of Na-H exchange. **Mol. Pharmacol.** 1992;41(6):1056-1060.
- Barkhof F, van Welderween M. Characterization of tissue damage in multiple sclerosis by nuclear magnetic resonance. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** 1999;34:1675-1686.
- Barnes J, Karin M. Nuclear factor kappa B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.** 1997;336:1066-1071.



- Baud O, Haynes RF, Wang H, Folkerth RD, Li J, Volpe JJ, Rosenberg PA. Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. **Eur. J. Neurosci.** 2004;20(1):29-40.
- Bauer W, Briner U, Doepfner W, Halber R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless J. SMS-201.995, a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. **Life Sci.** 1982;31:1133-1140.
- Baumeister H, Kreuzer OJ, Roosterman D, Schafer J, Meyerhof W. Cloning, expression, pharmacology and tissue distribution of the mouse somatostatin receptor subtype 5. **J. Neuroendocrinol.** 1998;10:449-452.
- Baumeister H, Wegner M, Richter D, Meyerhof W. Dual regulation of somatostatin receptor subtype 1 gene expression by pit-1 in anterior pituitary GH3 cells. **Mol. Endocrinol.** 2000;14:255-271.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990;87: 1620-1624.
- Bell GI, Yasuda K, Hong H, Law SF, Raynor K, Reisine T. Molecular biology of somatostatin receptors. *En Somatostatin and its receptors.* John Wiley & sons; 199. p. 65-88.
- Bernardo A, Greco A, Levi G, Minghetti L. Differential lipid peroxidation, Mn superoxide, and bcl-2 expression contribute to the maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 2003;62(5):509-519.
- Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F, Reindl M. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. **N. Engl. J. Med.** 2003;349(2):139-145.
- Berrendero F, Sánchez A, Cabranes A, Puerta C, Ramos JA, García-Merino A, Fernández-Ruiz J. Changes in cannabinoid CB(1) receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. **Synapse.** 2001;41:195-202.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature.** 1993;361(6410):315-325.
- Bhathena SJ, Louie J, Schechter GP, Redman RS, Wahl L, Recant L. Identification of human mononuclear leukocytes bearing receptors for somatostatin and glucagon. **Diabetes.** 1981;30:127-131.
- Bieber AJ, Kerr S, Rodríguez M. Efficient central nervous system remyelination requires T-cells. **Ann. Neurol.** 2003;53(5):680-684.
- Billiau A, Heremans H., Vandekerckhove F, Dijkmans R, Sobis H, Meulepas E, Carton H. Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-g. **J. Immunol.** 1988;140:1506-1510.
- Birnbaumer L, Abramovitz J, Yatani A, Okabe K, Mattera R, Graf R, Stanford J, Brown AM. Roles of G-proteins in coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. **Biochem. Molec. Biol.** 1990;25:225-244.
- Bisaglia M, Venezia V, Biglieri M, Russo C, Mancini F, Milanese C, Schettini G. alpha-Glycerolphosphorylethanolamine rescues astrocytes from mitochondrial impairment and oxidative stress induced by amyloid beta-peptides. **Neurochem. Int.** 2004;44(3):161-170.

- Bitsch A, Kuhlmann T, Da Costa C, Bunkowski S, Polak T, Brück W. Tumour necrosis factor alpha mRNA expression in early multiple sclerosis lesions: correlation with demyelinating activity and oligodendrocyte pathology. **Glia**. 2000;29(4):366-375.
- Blaser MJ, Parsonet J. Parasitism by the "slow" bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. **J. Clin. Invest.** 1994;94:4-8.
- Blum AM, Metwali A, Mathew RC, Cook G, Elliott D, Weinstock JV. Granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni have somatostatin receptors and respond to somatostatin with decreased IFN-gamma secretion. **J. Immunol.** 1992;149:3621-3626.
- Blum AM, Metwali A, Mathew RC, Elliott D, Weinstock JV. Substance P and somatostatin can modulate the amount of IgG2a secreted in response to schistosome egg antigens in murine schistosomiasis. **J. Immunol.** 1993;151:6994-7004.
- Blum AM, Elliott D, Metwali A, Li J, Qadir K, Weinstock JV. Substance P regulates somatostatin expression in inflammation. **J. Immunol.** 1998;161:6316-6322.
- Bo L, Dawson T, Wesselingh S. Induction of the nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. **Ann. Neurol.** 1994;36:778-786.
- Bolton C, Flower RJ. The effects of the anti-glucocorticoid RU38486 on steroid-mediated suppression of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in the Lewis rat. **Life Sci.** 1989;45(1):97-104.
- Bona E, Aden U, Fredholm BB, Hagberg H. The effect of long term caffeine treatment on hypoxic-ischemic brain damage in the neonate. **Pediatr. Res.** 1995;38:312-318.
- Bordi C, D'Adda T, Azzoni C, Ferraro G. The somatostatin cell. Lomax P, Scarpignato C, Vesell ES, eds. En: Progress in Basic and Clinical Pharmacology. Basel. Karger;1996. p. 2-22.
- Bourrié B, Bribes E, Esclançon M, Garcia L, Marchand J, Thomas C, Maffrand JP, Casellas P. The neuroprotective agent SR 57746A abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis and impairs associated blood-brain barrier disruption: implications for multiple sclerosis treatment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1999;96(22):12855-12859.
- Braida D, Pegorini S, Arcidiaconi MV, Consalez GG, Croci L, Sala M. Post-ischemic treatment with cannabidiol prevents electroencephalographic flattening, hyperlocomotion and neuronal injury in gerbils. **Neurosci. Lett.** 2003;346:61-64.
- Brakch N, Galanopoulou AS, Patel YC, Boileau G, Sedah NG. Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. **FEBS Lett.** 1995;362:143-146.
- Brakch N, Rholam M, Boussetta H, Cohen P. Role of beta-turn in proteolytic processing of peptide-hormone precursor at dibasic sites. **Biochemistry** 1993;432:4925-4930.
- Brand A, Gil S, Yavin E. N-methyl bases of ethanolamine prevent apoptotic cell death induced by oxidative stress in cells of oligodendroglia origin. **J. Neurochem.** 2000;74(4):1596-1604.
- Brandt D. R. and Ross E. M. GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates. **J. Biol. Chem.** 1985;260: 266-272.



- Brazeau P, Vale WW, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic peptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. **Science**. 1973; 179:77-79.
- Brenner T, Brocke S, Szafer F. Induction of nitric oxide synthase in for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol**. 1997;158:2940-2946.
- Brownell B, Hugues JT. The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 1962;25:315-320.
- Bruck, W. Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. **J. Neurol**. 2005;252(Supl. 5):v10-v15.
- Bruno JF, Xu Y Song J, Berelowitz M. Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1992;89:11151-11155.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food deprived and diabetic rat. **Endocrinology** 1994;135:1787-1792.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. **Endocrinology** 1993;133:2561-2567.
- Burton KA, Kabigting EB, Clifton DK, Steiner RA. Growth-hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in hypothalamic somatostatin neurons. **Endocrinology** 1992;130:958-963.
- Buscail L, Delesque N, Esteve JP, Saint-Laurent N, Prats H, Clerc P, Roberecht P, Bell GI, Liebow C, Schally AV. Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1994;91:2315-2319.
- Buscail L, Esteve JP, Saint-Laurent N, Bertrand V, Reisine T, O'Carroll AM, Bell GI, Schally AV, Vaysse N, Susini C. Inhibition of cell proliferation by the somatostatin analogue RC-160 is mediated by somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 through different mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1995;92:1580-1584.
- Cabranes A, Pryce G, Baker D, Fernandez-Ruiz J. Changes in CB1 receptors in motor related brain structures of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis mice. **Brain Res**. 2006;1107:199-205.
- Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Sánchez A, Mestre L, Valenti M, García-Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J. Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. **Neurobiol. Dis**. 2005;20:207-217.
- Calzá L, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L. Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors and increases a myelin-forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002;99(5):3258-3263.
- Cardoso A, el Ghamrawy C, Gautron JP, Horvath B, Gautier N, Enjalbert A, Krantic S. Somatostatin increases mitogen-induced IL-2 secretion and proliferation of human Jurkat T cells via sst₃ receptor isotype. **J. Cell. Biochem**. 1998;68:62-73

- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA. Differential expresión of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. **Int. Immunopharmacol.** 2002;2:69-82.
- Carroll WM, Jennings AR. Early recruitment of oligodendrocyte precursors n CNS remyelination. **Brain** 1994;117:63-78.
- Casnici C, Lattuada D, Perego C, Franco P, Marelli O. Inhibitory effect of somatostatin on human T lymphocyte proliferation. **Int. J. Immunopharmacol.** 1997;19:721-727.
- Cattaneo MG, Amoroso D, Gussoni G, Sanguini AM, Vicenti LM. A somatostatin analogue inhibits MAP kinase activation and cell proliferation in human neuroblastoma and in human small cell lung carcinoma cells lines. **FEBS Lett.** 1996;396:164-168.
- Cercignani M, Bozzali M, Iannucci G, Comi G, Filippi M. Magnetisation transfer ratio and mean diffusivity of normal appearing white and grey matter from patients with multiple sclerosis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.** 2001;70(3):311-317.
- Cha-Molstad H, Keller DM, Yochum GS, Impey S, Goodman RH. Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2004;101(37):13572-13577.
- Chao TC, Cheng HP, Walter RJ. Somatostatin and macrophage function modulation of hydrogen peroxide, nitric oxide and tumor necrosis factor release. **Regulatory Peptides** 1995;58(1-2):1-10.
- Chard DT, Griffin CM, Parker GJM, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. **Brain** 2002;125:327-337.
- Chen C, Zhang J, Vincent JD, Israel JM. Two types of voltage dependent calcium current in rat somatotrophs are reduced by somatostatin. **J. Physiol. (Lond.)** 1990;425:29-42.
- Chen L, Fitzpatrick VD, Vandlen RL, Tashjian AH Jr. Both overlapping and distinct signalling pathways for somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2 in pituitary cells. **J. Biol. Chem.** 1997;272:18666-18672.
- Chen L, Tashjian AH Jr. Identification of distinct signalling pathways for somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2 as revealed by microphysiometry. **Cell Signal.** 1999;11(7):499-505.
- Clerico M, Contessa G, Durelli L. Interferon-beta1a for the treatment of multiple sclerosis. **Expert. Opin. Biol Ther.** 2007;7(4):535-542.
- Coari G, di Franco M, Iagnocco A, di Novi MR, Mauceri MT, Ciocci A. Intra-articular somatostatin 14 reduces synovial thickness in rheumatoid arthritis: an ultrasonographic study. **Int. J. Clin. Pharmacol. Res.** 1995;15:27.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. **Lancet** 2002;359(9313):1221-1231.
- Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H. **McAlpine's multiple sclerosis.** 3rd edition. 1998.
- Constantinescu CS, Wysocka M, Hilliard B, Ventura ES, Lavi E, Trinchieri G, Rostami A. Antibodies against IL-12 prevent superantigen-induced and spontaneous relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.** 1998;161(9):5097-5104.



- Cooper PE, Fernstrom MH, Rorstad OP, Leeman SE, Martin JB. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. **Brain Res.** 1981;218:219-232.
- Cordelier P, Esteve JP, Bousquet C. Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1997;94:9343-9348.
- Cotman CW, Anderson KJ. Synaptic plasticity and functional stabilization in the hippocampal formation: possible role in Alzheimer's disease. **Adv. Neurol.** 1988;47:313-335.
- Cronin MH, Rojol AD, Myers GA, Hewlett EL. Pertussis toxin blocks the somatostatin induced inhibition of growth hormone release and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation. **Endocrinology** 1983;113:209-215.
- Cross AH, Manning PT, Keeling RM, Schmidt RE, Misko TP. Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 1998;88:45-56.
- Cross AH, San M, Stern MK, Keeling RM, Salvemini D, Misko TP. A catalyst of peroxynitrite decomposition inhibits murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol.** 2000;107:21-28.
- Croxford JL, Miller SD. Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannaminoid R (+) WIN55,212. **J. Clin. Invest.** 2003;111:1231-1240.
- Csaba Z, Dournaud P. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides.* 2001;35(1):1-23.
- Csaba Z, Pirker S, Lelouvier B, Simon A, Videau C, Epelbaum J, Czech T, Baumgartner C, Sperk G, Dournaud P. Somatostatin receptor type 2 undergoes plastic changes in the human epileptic dentate gyrus. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 2005;64(11):956-969.
- Czernik AJ, Petrack V. Somatostatin receptor binding in rat cerebral cortex. Characterization using a nonreducible somatostatin analog. **J. Biol. Chem.** 1983;285: 5525-5230.
- Dahlman I, Wallstrom E, Weissert R, Storch m, Kornek B, Jacobson L, Linington C, Luthman H, Lassmann H, Olsson T. Linkage analysis of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat identifies a locus controlling demyelination on chromosome 18. **Hum. Mol. Genet.** 1999;8(12):2183-2190.
- Dalton CM, Brex PA, Jenkins R, Fox NC, Miszkiel KM, Crum WR. Progressive ventricular enlargement in patients with clinically isolated syndromes is associated with the early development of multiple sclerosis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 2002;73(2):141-147.
- Das A, Guyton MK, Matzelle DD, Ray SK, Banik NL. Time-dependent increases in protease activities for neuronal apoptosis in spinal cords of Lewis rats during development of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neurosci. Res.** 2008;86(13):2992-3001.
- Dasgupta S, Zhou Y, Jana M, Banik NL, Pahan K. Sodium phenylacetate inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice at multiple steps. **J Immunol.** 2003;170(7):3874-3882.
- Davison, AN, Watson CM, Owen SJ, Calder VL. Nervous and immune system disorders in multiple sclerosis. **Brain Behav. Immun.** 1988;2(4):335-340.

- Day ED, Hashim GA, Ireland DJ and Potter NT. Polyclonal antibodies to the encephalitogenic neighborhood of myelin basic protein: singular affinity populations neutralized by specific synthetic peptide probes. **J Neuroimmunol** 1986;13:143-158.
- De Duve C, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). **Physiol. Rev.** 1966;46(2):323-357.
- Defazio G, Nico B, Trojano M, Ribatti D, Giorelli M, Ricchiuti F, Martino D, Roncali L, Livrea P. Inhibition of protein kinase C counteracts TNF α -induced intercellular adhesion molecule 1 expression and fluid phase endocytosis on brain microvascular endothelial cells. **Brain Res.** 2000;863(1-2):245-248.
- Delumeau JC, Marin P, Tence M, Cordier J, Glowinski J, Premont J. Synergistic regulation of cytosolic Ca²⁺ concentration by somatostatin and alpha 1-adrenergic agonists in mouse astrocytes. **J. Physiol. Paris.** 1992;86(1-3):31-38.
- De March AK, De Bouwerie M, Kolopp-Sarde MN, Faure GC, Béné MC, Bernard CCA: Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein B-cell responses in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 2003;135:117-125.
- Demchyshyn LL, Srikant CB, Sunahara RK, Kent G, Seeman P, Van Tol HH, Panetta R, Patel YC, Niznik HB. Cloning and expression of a human somatostatin-14-selective receptor variant (somatostatin receptor 4) located on chromosome 20. **Mol. Pharmacol.** 1993;43(6):894-901.
- De Simone R, Micera A, Tirassa P, Aloe L. mRNA for NGF and p75 in the central nervous system of rats affected by experimental allergic encephalomyelitis. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** 1996;22(1):54-59.
- De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, Antel JP, Arnold DL. Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. **Brain** 1998;121:1469-1477.
- De Stefano N, Guidi L, Stromillo ML, Bartolozzi ML, Federico A. Imaging neuronal and axonal degeneration in multiple sclerosis. **Neurol. Sci.** 2003;24(Supl. 5):S283-S286.
- Delmas P, Brown DA, Dayrell M, Abogadie FC, Caulfield MP, Buckley NJ. On the role of endogenous G-protein beta gamma subunits in N-type-Ca²⁺ current inhibition by neurotransmitters in rat sympathetic neurones. **J. Physiol (Lond.)** 1998;506 (pt 2):319-329.
- Delesque N, Buscaïl L, Esteve JP, Saint-Laurent N, Muller C, Weckbecker G, Bruns C, Vaysse N, Susini C. sst₂ somatostatin receptor expression reverses tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. **Cancer Res.** 1997;57:956-962.
- Dhariwal APS, Krulich L, Katz S, McCann SM. Purification of growth hormone releasing hormone. **Endocrinology.** 1965; 77:932.
- Dharmasaroja P: Specificity of autoantibodies to epitopes of myelin proteins in multiple sclerosis. **J Neurol Sci** 2003;206:7-16.
- D'Intino G, Paradisi M, Fernandez M, Giuliani A, Aloe L, Giardino L, Calza L.. Cognitive deficit associated with cholinergic and nerve growth factor down-regulation in experimental allergic encephalomyelitis in rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 2005;102:3070-3075



- Di Chiara G, Porceddu ML, Imperato A, Morelli M. Role of GABA neurons in the expression of striatal motor functions. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.** 1981;30:129-163.
- Di Marco R, Khademi M, Wallstrom E, Iacobaeus E, Salvaggio A, Caracappa S, Papoian R, Nicoletti F and Olsson T. Curative effects of recombinant human interleukin-6 in DA rats with protracted relapsing experimental allergic encephalomyelitis. **J Neuroimmunol** 2001;116:168-177.
- Di Marco R, Puglisi G, Paccio G, Nicoletti A, Patti F, Reggio A, Bendtzen K, Nicoletti F. Sodium fusidate (fusidin) ameliorates the course of monophasic experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. **Mult Scler.** 2001;7:101-104.
- Dohlmann HG, Caron MG, Deblase A, Frielle T, Lefkowitz RJ. Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the β 2-adrenergic receptor. **Biochemistry** 1990;29:2335-2342.
- Domingo JC, Mora M, Africa de Madariaga M. Role of headgroup structure in the phase behaviour of N-acylethanolamine phospholipids: hydrogen-bonding ability and headgroup size. **Chem. Phys. Lipids.** 1994;69(3):229-240.
- Dournaud P, Boudin H, Schonbrunn A, Tannenbaum GS, Beaudet A. Interrelationships between sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. **J. Neurosci.** 1998;18:1056-1071.
- Dournaud P, Gu YZ, Schonbrunn A, Mazella J, Tannenbaum GS, Beaudet A. Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific antipeptide antibody. **J Neurosci** 1996;16:4468-4478.
- Dudek I, Zagorski T, Liskiewicz J. Effect of gamma radiation on selected indicators of oxygen metabolism in erythrocytes of patients with multiple sclerosis. **Neurol. Neurochir. Pol.** 1992;26:34-39.
- Duncan ID, Grever WE, Zhang SC. Repair of myelin disease: strategies and progress in animal models. **Mol. Med. Today** 1997;3:554-561.
- Duong TT, Finkelman FD, Singh B, Strejan GH. Effect of anti-interferon-g monoclonal antibody treatment on the development of experimental allergic encephalomyelitis in resistant mouse strains. **J. Neuroimmunol.** 1994;53:101-107.
- Dutar P, Vailland C, Viollet C, Billard JM, Potier B, Carlo AS, Ungerer A, Epebaum J. Spatial learning and synaptic hippocampal plasticity in type 2 somatostatin receptor knock-out mice. **Neurosci** 2002;112:455-466.
- Eaton KA, Mefford M, and Thevenot T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. **J. Immunol.** 2001;166:7456-7461.
- Ebadi M, Bashir RM, Heidrick ML, Hamada FM, Refaey HE, Hamed A, Helal G, Baxi MD, Cerutis DR, Lassi NK. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. **Neurochem. Int.** 1997;30(4-5):347-374.
- Eglezos A, Andrews PV, Helme RD. In vivo inhibition of the rat primary antibody response to antigenic stimulation by somatostatin. **Immunol. Cell. Biol.** 1993;71:125-129.

- Elliott DE, Blum AM, Li J, Metwali A, Weinstock JV. Preprosomatostatin messenger RNA is expressed by inflammatory cells and induced by inflammatory mediators and cytokines. **J. Immunol.** 1998;160(8):3997-4003.
- Elliott DE, Li J, Blum AM, Metwali A, Patel YC, Weinstock JV. SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN- γ release. **Eur. J. Immunol.** 1999;29:2454-2463.
- Epelbaum J, Tapia Arancibia L, Kordon C, Enjalbert A. Characterization, regional distribution, and subcellular distribution of ¹²⁵I-Tyr¹-somatostatin binding sites in rat brain. **J. Neurochem.** 1982 Jun;38(6):1515-1523.
- Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Ammon S, Riechert U, Höllt V. Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2, 3, 5 and 6 mRNA in the rat brain. **Brain Res Mol Brain Res.** 2001;95:129-137.
- Espejo C, Penkowa M, Sáez-Torres I, Hidalgo J, García A, Montalbán X, Martínez-Cáceres EM. Interferon- γ regulates oxidative stress during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Exp. Neurol.** 2002;177:21-31.
- Espejo C, Penkowa M, Demestre M, Montalbán X, Martínez-Cáceres EM. Time-course expression of CNS inflammatory, neurodegenerative tissue repair markers and metallothioneins during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neuroscience.** 2005;132(4):1135-1149.
- Fais S, Annibale B, Boirivant M, Santori A, Pallone F, Delle Fave G. Effects of somatostatin on human intestinal lamina propria lymphocytes. Modulation of lymphocyte activation. **J. Neuroimmunol.** 1991;31 :211-219.
- Fardoun RZ, Asghar M, Lokhandwala M. Role of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in oxidative stress-induced defective dopamine D1 receptor signaling in the renal proximal tubules of Sprague-Dawley rats. **Free Radic. Biol. Med.** 2007;42(6):756-764.
- Feindt J, Schmidt A, Mentlein R. Receptors and effects of the inhibitory neuropeptide somatostatin in microglial cells. **Mol. Brain Res.** 1998;60:228-233.
- Felley CP, O'Dorisio TM, Howe B, Coy DH, Mantey SA, Pradhan TK, Sutliff VE, Jensen RT. Chief cells possess somatostatin receptors regulated by secretagogues acting through the calcium or cAMP pathway. **Am. J. Physiol.** 1994;266(5 Pt 1):G789-G798.
- Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowska JA, Livnat S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. **J Immunol** 1985;135:755s-765s.
- Ferone D, van Hagen M, van Koestveld PM, Zuiderwijk J, Mooy DM, Lichtenauer-Kaligis EGR, Colao A, Bogers AJJC, Lombardi G, Lamberts SWJ, Hofland LJ. In vitro characterization of somatostatin receptors in human thymus and effects of somatostatin and octreotide on cultured thymic epithelial cells. **Endocrinology** 1999;140:373-379.
- Ferrer-Alcón M, La Harpe R, García-Sevilla JA. Decreased immunodensities of micro-opioid receptors, receptor kinases GRK 2/6 and beta-arrestin-2 in postmortem brains of opiate addicts. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 2004;121(1-2):114-122.



- Florenzano F, Bentivoglio M. Degranulation, density, and distribution of mast cells in the rat thalamus: a light and electron microscopic study in basal conditions and after intracerebroventricular administration of nerve growth factor. **J. Comp. Neurol.** 2000;424(4):651-669.
- Florio T, Yao H, Carey KD, Dillon TJ, Stork PJS. Somatostatin activation of mitogen activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1) **Mol. Endocrinol.** 1999;13:37.
- Fontoura P, Steinman L, Miller A. Emerging therapeutic targets in multiple sclerosis. **Curr. Opin. Neurol.** 2006;19(3):260-266.
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR. Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. **Science** 1998;280:1271-1274.
- Fox RJ and Ransohoff RM. New directions in MS therapeutics: vehicles of hope. **Trends. Immunol.** 2004;25(12):632-636.
- Franklin RJM, Goldman JE. Remyelination by endogenous glia. En: Lazzarini RA, editor, Myelin biology and disorders. San Diego: Elsevier; 2004. p. 143-172.
- Franklin RJM. Remyelination of the demyelinated CNS: the case for and against transplantation of central, peripheral or olfactory glia. **Brain Res. Bull.** 2002;57:827-832.
- Frei K, Siepl C, Groscurth P, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-g-treated microglial cells. **Eur. J. Immunol.** 1987;17:1271-1278.
- Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature.** 1998 Oct 22;395(6704):763-770.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. **Annu. Rev. Neurosci.** 2004;27:107-144.
- Garcia-Sevilla JA, Ventayol P, Perez V, Rubovszky G, Puigdemont D, Ferrer-Alcon M, Andreoli A, Guimon J, Alvarez E. 2004. Regulation of platelet alpha 2Aadrenoceptors, Gi proteins and receptor kinases in major depression: effects of mirtazapine treatment. **Neuropsychopharmacology** 2004;29(3):580-588.
- Gardinier MV, Amiquet P, Linington C, Matthieu M. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. **J. Neurosci. Res.** 1992;33(1):177-187.
- Garrett B, Finsen B, Wree A. Parcellation of cortical areas by in situ hybridization for somatostatin mRNA in the adult rat: frontal, parietal, occipital, and temporal regions. **Anat. Embryol. (Berl).** 1994;190(4):389-398.
- Genain CP, Ngnyen MH, Letvin NL: Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. **J Clin Invest** 1995;96:2966-2974.
- Gensert JM, Goldman JE. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. **Neuron** 1997;19:197-203.
- Gilgun-Sherki Y, Panet H, Melamed E, Offen D. Riluzole suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): implications for the treatment of MS. **Brain Res.** 2003;989:196-204.
- Gilman AG. G-proteins: transducers of receptor-generated signals. **Ann. Rev. Biochem.** 1987;56:615-49.
- Giulian D, Baker TJ. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. **J. Neurosci.** 1986;6:2163-2178.

- Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]DOPA in various regions of the brain. **J. Neurochem.** 1966;13:655-669.
- Gold DP, Schroeder K, Powell HC, Kelly C. Nitric oxide and the immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis. **Eur. J. Immunol.** 1997;27:2863-2869.
- Gonsette RE. New immunosuppressants with potential implication in multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.** 2004;223:87-93.
- Gonsette RE. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. **J. Neurol. Sci.** 2008a;274:48-53.
- Gonsette RE. Oxidative stress and excitotoxicity: a therapeutic issue in multiple sclerosis? **Mult. Scler.** 2008b;14:22-34.
- Goodman RH, Reh fuss RP, Verhave, M Ventimiglia R, Low MJ. Somatostatin gene regulation: an overview. **Metabolism** 1990; 39:2-5.
- Goodkin DE, Shulman M, Winkelhake J, Waubant E, Andersson P, Stewart T, Nelson S, Fischbein N, Coyle PK, Frohman E, Jacobs L, Holcenberg J, Lee M, Mocchi S. A phase I trial of solubilized DR2:MBP84-102 (AG284) in multiple sclerosis. **Neurology.** 2000;54(7):1414-1420.
- Gordeladze JO, Björo T, Torjesen PA, Ostberg BC, Haug E, Gautvik KM. Protein kinase C stimulates adenylate cyclase activity in prolactin-secreting rat adenoma (GH4C1) pituicytes by inactivating the inhibitory GTP-binding protein Gi. **Eur. J. Biochem.** 1989;183(2):397-406.
- Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. **Biochem. J.** 1963;89:114-123.
- Greenwood MT, Robertson LA, Patel YC. Cloning of the gene encoding human somatostatin receptor 2: sequence analysis of the 5'-flanking promoter region. **Gene** 1995;159:33-37.
- Grillo-López AJ, Hedrick E, Rashford M, Benyunes M. Rituximab: ongoing and future clinical development. **Semin. Oncol.** 2002;29(suppl. 2):105-112.
- Grimaldi M, Florio T, Schettini G. Somatostatin inhibits interleukin 6 release from rat cortical type I astrocytes via the inhibition of adenylyl cyclase. **Biochem Biophys Res Commun** 1997;235(1):242-248.
- Gromada J, Hoy M, Buschard K, Salehi A, Rorsman P. Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic alpha-cells by G(i2)-dependent activation of calcineurin and depriming of secretory granules. **J Physiol.** 2001;535(Pt 2):519-532.
- Grundke-Iqbal I, Lassmann H, Wisniewski HM. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Immunohistochemical studies. **Arch. Neurol.** 1980;37:651-656.
- Hall ED. Novel inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation for neurodegenerative disorders. **Ann. Neurol.** 1992;32:S137-S142.
- Halle vorden J. Die zentralen entmarkungserkrankungen. **Dtsch. Z Nervenheilk** 1940;150:201-239.
- Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 2001;41:145-174.



- Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Petersen G. N-Acylethanolamines and precursor phospholipids - relation to cell injury. **Chem. Phys. Lipids.** 2000;108(1-2):135-150.
- Hansen HS, Moesgaard B, Petersen G, Hansen HH. Putative neuroprotective actions of N-acyl-ethanolamines. **Pharmacol. Ther.** 2002;95(2):119-126.
- Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. **J Neurochem.** 2007 Apr;101(2):566-576.
- Hartung HP, Kieseier BC. Targets for the therapeutic action of interferon-beta in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.** 1996;40(6):825-826.
- Hashim GA, Day ED, Fredane L, Intintola P and Carvalho E. Biological activity of region 65-102 of the myelin basic protein **J Neurosci Res** 1986;16:467-478.
- Hashim GA and Day ED. Role of antibodies in T cell-mediated experimental allergic encephalomyelitis. **J Neurosci Res** 1988;21:1-5.
- Hathway GJ, Humphrey PP, Kendrick KM. Somatostatin release by glutamate in vivo is primarily regulated by AMPA receptors. **Br. J. Pharmacol.** 2001;134(6):1155-1558.
- Hauser F, Meyerhof W, Wulfen I, Schonrock C, Richter D. Sequence analysis of the promoter region of the rat somatostatin receptor subtype 1 gene. **FEBS Lett.** 1994;345:225-228.
- Heber-Katz E. The ups and downs of EAE. **Int. Rev. Immunol** 1993;9:277-285.
- Hernanz A, Tato E, De la Fuente M, de Miguel E, Arnalich F. Differential effects of gastrin-releasing peptide, neuropeptide Y, somatostatin and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by whole blood cells from healthy young and old subjects. **J. Neuroimmunol.** 1996;71:25.
- Hervas-Aguilar A, Puebla-Jimenez L, Burgos-Ramos E, Aguado-Llera D, Arilla-Ferreiro E. Effects of single and continuous administration of amyloid beta-peptide (25-35) on adenylyl cyclase activity and the somatostatinergic system in the rat frontal and parietal cortex. **Neurosci.** 2005;135(1):181-190.
- Heyser CJ, Masliah E, Samimi A, Campbell IL, Gold LH. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1997;94(4):1500-1505.
- Hierowski MT, Liebow C, Du Sapin K, Schally AV. Stimulation by somatostatin of dephosphorilation of membrane proteins in pancreatic cancer Mia PaCA-2 cell line. **FEBS Lett.** 1985;179:252-256.
- Hill KE, Zollinger LV, Watt HE, Carlson NG, Rose JW. Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiple sclerosis plaques: distribution, cellular expression and association with myelin damage. **J. Neuroimmunol.** 2004;151:171-179.
- Hinks GL, Franklin RJM. Distinctive patterns of PDGF-A, FGF-2, IGF-I and TGF-beta1 gene expression during remyelination of experimentally induced spinal cord demyelination. **Mol. Cel. Neurosci.** 1999;14:153-168.
- Hipkin RW, Friedman J, Clark RB. Agonist-induced desensitization, internalization and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor. **J. Biol. Chem.** 1997;272:13869-13876.



- Hipkin RW, Wang Y, Schonbrunn A. Protein kinase C activation stimulates the phosphorylation and internalization of the sst2A somatostatin receptor. **J. Biol. Chem.** 2000;275(8):5591-5599.
- Hiruma K, Koike T, Nakamura H, Sumida T, Maeda T, Tomioka H, Yoshida S, Fujita T. Somatostatin receptors on human lymphocytes and leukaemia cells. **Immunology.** 1990;71:480-485.
- Hiyama H, Emson PC. Distribution of somatostatin mRNA in the rat nervous system as visualized by a novel non-radioactive *in situ* hybridization procedure. **Neuroscience** 1990;38:223-244.
- Hokfelt T, Effendic S, Hellerström C, Johansson O, Luft R, Arimura A. Cellular localization of somatostatin in neuroendocrine-like cells and neurons of the rat with special preferences to the A1 cells of the pancreatic islets and to the hypothalamus. **Acta Endocrinol.** 1975; 80:5-41.
- Holz A, Bielekova B, Martin R, Oldstone MB. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis. **J. Immunol.** 2000;164(2):1103-1109.
- Honnegger J, Spagnoli A, D'Urso R, Navarra P, Tsagarakis S, Besser GM, Grossman AB. Interleukin-1 beta modulates the acute release of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from rat hypothalamus *in vitro*, whereas tumor necrosis factor and interleukin-6 have no effect. **Endocrinology** 1991;129:1275-1282.
- Hooper DC, Bagasra O, Marini JC. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1997;94:2528-2533.
- Hooper DC, Spitsin S, Kean RB. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1998;95:675-680.
- Hostmeyer A, Henning C, Sauer T, Müller-Esterl W, Schroeder C. Palmitoylation of endothelin receptor A. **J. Biol. Chem.** 1996;271:20811-20819.
- Houslay MD, Metcalfe JC, Warren GB, Hesketh TR, Smith GA. The glucagon receptor of rat liver plasma membrane can couple to adenylate cyclase without activating it. **Biochim. Biophys. Acta** 1976;436:489-494.
- Hoyer D, Lübbert H, Bruns C. Molecular pharmacology of somatostatin receptors **Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.** 1994;350:441-453.
- Huang Y, Blatt LM, Taylor MW. Type 1 interferon as an antiinflammatory agent: inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta and induction of interleukin-1 receptor antagonist. **J. Interferon Cytokine Res.** 1995;15(4):317-321.
- Hukovic N, Panetta R, Kumar U, Patel YC. Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation. **Endocrinology** 1996;137:4046-4049.
- Hukovic N, Rocheville M, Kumar U, Sasi R, Khare S, Patel YC. Agonist-dependent upregulation of human somatostatin receptor type 1 requires molecular signals in the cytoplasmic C-tail. **J Biol Chem.** 1999;274(35):24550-24558.



- Hunter MIS, Niedmadin S, Davidson DLW. Lipid peroxidation produces and antioxidants proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. **Neurochem. Res.** 1985;10:1645-1652.
- Hurley D, Phelps CJ. Hypothalamic preprosomatostatin messenger-ribonucleic-acid expression in mice transgenic for excess or deficient endogenous growth-hormone. **Endocrinology** 1992;130:1809-1815.
- Isihara S, Hassan S, Kinoshita Y, Moriyama N, Fukuda R, Maekawa T, Okada A, Chiba T. Growth inhibitory effects of somatostatin on human leukaemia cell lines mediated by somatostatin receptor subtype 1. **Peptides** 1999;20:313-318.
- Izquierdo-Claros RM, Boyano-Adánez Mdel C, Arilla-Ferreiro E. Activity of the hippocampal somatostatinergic system following daily administration of melatonin. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 2004;126(2):107-113.
- Jagannatha HM, Sastry PS. Enzymes of ethanolamine plasmalogen metabolism in neuron- & glial-enriched fractions of rat brain. **Indian J. Biochem. Biophys.** 1981;18(6):406-410.
- Jack CS, Kuhlmann T, Antel JP. Differential susceptibility of human adult oligodendrocytes to injury mediated by nitric oxide and peroxynitrite. **Neurology.** 2004;62(Suppl 5): A117 (abstract).
- Jaiswal BS, Conti M. Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. **J. Biol. Chem.** 2001;276(34):31698-31708.
- Jaquin T, Champagnat J, Madamba S, Denavit-Saubie M, Siggins GR. Somatostatin depresses excitability in neurons of the solitary tract complex through hyperpolarization and augmentation of IM, a non-inactivating voltage dependent outward current blocked by muscarinic agonists. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1988;85:948-952.
- Jeong SW, Ikeda SR. Effect of G protein heterotrimer composition on coupling of neurotransmitter receptors to N-type-Ca(2+) channel modulation in sympathetic neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2000;97:907-912.
- Joëls M, Madamba SG, Moore SD, Morrison JH, Siggins GR. Somatostatin immunohistochemistry of hippocampal slices with lucifer yellow-stained pyramidal neurons responding to somatostatin. **Regul. Pept.** 1990;28(2):215-221.
- Johansson O, Hokfelt T, Elde RP. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. **Neuroscience** 1984;13:265-339.
- Juhler M. Pathophysiological aspects of acute experimental allergic encephalomyelitis. **Acta Neurol. Scand. Suppl.** 1988;119:1-21.
- Jung S, Donhauser T, Toyka KV, Hartung HP. Propentofylline and iloprost suppress the production of TNF- α by macrophages but fail to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. **J. Autoimmunity.** 1997;10:519-529.
- Kabat EA, Wolf A, Bezer AE. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in Rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. **J. Exp. Med.** 1947;85(1):117-130.
- Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, Tolis G. Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction *in vivo*. **J. Clin. Invest.** 1994;93:2000.

- Karp CL, van Boxel-Dezaire AH, Byrnes AA, Nagelkerken L. Interferon-beta in multiple sclerosis: altering the balance of interleukin-12 and interleukin-10? **Curr. Opin. Neurol.** 2001;14(3):361-368.
- Karpus WJ, Swanborg RH. Protection against experimental autoimmune encephalomyelitis requires both CD4⁺ T suppressor cells and myelin basic protein-primed B cells. **J. Neuroimmunol.** 1991;33(2):173-177.
- Katada T, Gilman AG, Watanabe Y, Bauer S, Jakobs KH. Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *Eur. J. Biochem.* 1985;151(2):431-437.
- Kaupmann K, Bruns C, Hoyer D, Seuwen K, Lübbert H. Distribution and second messenger coupling of four somatostatin receptor subtypes expressed in brain. **FEBS Lett.** 1993;331:53-59.
- Kaye JF, Kerlero de Rosbo N, Mendel I, Fletcher S, Hoffman M, Yust I, Ben-Nun A. The central nervous system-specific myelin oligodendrocytic basic protein (MOBP) is encephalitogenic and potential target antigen in multiple sclerosis (MS). **J. Neuroimmunol.** 2000;102(2):189-198.
- Keirstead HS, Blakemore WF. Identification of post-mitotic oligodendrocytes incapable of remyelination within the demyelinated adult spinal cord. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 1997;56:1191-1201.
- Kelly E, Bailey CP, Henderson G. Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. **Br. J. Pharmacol.** 2008 Mar;153 Suppl 1:S379-S388.
- Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. **J. Biol. Chem.** 1956 Sep;222(1):193-214.
- Kerlero de Rosbo N, Bernard CC, Simmons RD, Carnegie PR. Concomitant detection of changes in myelin basic protein and permeability of blood-spinal cord barrier in acute experimental autoimmune encephalomyelitis by electroimmunoblotting. **J. Neuroimmunol.** 1985;9(6):349-361.
- Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen IV, Revesz T. Cortical lesions in multiple sclerosis. **Brain** 1999;122:17-26.
- Kimata H, Yoshida A, Fujimoto M, Mikawa H. Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin and substance P on spontaneous IgE and IgG4 production in atopic patients. **J. Immunol.** 1993;150:4630-4640.
- Kimura N, Tomizawa S, Arai KN, Kimura N. Chronic treatment with estrogen up-regulates expression of sst2 messenger ribonucleic acid (mRNA) but down-regulates expression of sst5 mRNA in rat pituitaries. **Endocrinology.** 1998;139(4):1573-1580.
- Kimura N, Tomizawa S, Arai KN, Osamura RY, Kimura N. Characterization of 5' flanking region of rat somatostatin receptor ss2 gene: transcriptional regulatory elements and activation by Pitx1 and estrogen. **Endocrinology.** 2001;142(4):1427-1441.
- Kitajka K, Martínez E, Miralles A, Escrivá PV. Role of phosphatidylethanolamine in G-protein coupled receptor-associated signal transduction. **Adv. Exp. Med. Biol.** 2002;507:491-496.
- Klinkert WE, Kojima K, Lesslauer W, Rinner W, Lassman H, Wekerle H, TNF-alpha receptor fusion protein prevents experimental auto-immune encephalomyelitis and demyelination in Lewis rats: an overview. **J. Neuroimmunol.** 1997;72:163-168.



- Kluxen FW, Bruns C, Lübbert H. Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1992;89:4618-4622.
- Kolb B. Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. **Brain Res.** 1984;320(1):65-98.
- Komorowski J, Stepien H. Somatostatin (SRIF) stimulates the release of IL-6 (IL-6) from human peripheral blood monocytes (PBM) in vitro. **Neuropeptides** 1995;29:77-81.
- Kong H, DePaoli AM, Breder CD, Yosuda K, Bell GI, Reisine T. Differential expression of messenger RNAs for somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSTR2 and SSTR3 in adult rat brain: analysis by RNA blotting and in situ hybridization histochemistry. **Neuroscience** 1994;59:175-184.
- Koprowski H, Zheng YM, Heber-Katz E. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. **Lancet** 1993;2:1121-1125.
- Kornek B, Storch MK, Weissert R, Walstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassman H. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. **Am. J. Pathol.** 2000;157(1):267-276.
- Kozasa T, Kaziro Y, Ohtsuka T, Grigg JJ, Nakajima S, Nakajima Y. G protein specificity of the muscarine-induced increase in an inward rectifier potassium current in AtT20 cells. **Neurosci. Res.** 1996;26:289-297.
- Kramer D, Caruso A, Nicoletti F, Genazzani AA. Somatostatin and the somatostatin receptor 2 are reciprocally controlled by calcineurin during cerebellar granule cell maturation. **J. Neurochem.** 2005;94(5):1374-1383.
- Krantic S. Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin. **Peptides** 2000;21:1941-1964.
- Kraus J, Wöltje M, Schönwetter N, Höllt V. Gene structure and regulation of the somatostatin receptor type 2. **J. Physiol. Paris.** 2000;94(3-4):199-204.
- Krcó CJ, Gores A, Go VL. Gastrointestinal regulatory peptides modulate in vitro immune reaction of mouse lymphoid cells. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 1986(a);39:308-318.
- Krcó CJ, Gores A, Go VL. Gastrointestinal regulatory peptides modulate mouse lymphocytes functions under serum-free conditions in vitro. **Immunol. Invest.** 1986(b);15:103-111.
- Kreienkamp HJ, Hönck HH, Richter D. Coupling of rat somatostatin receptor subtypes to a G-protein gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK1). **FEBS Lett.** 1997;419(1):92-94.
- Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Baker WH, Breeman WAP, Kooij PP, Oei HY, van Hagen PM, Postema PT, Jong de M, Reubi JC. Somatostatin receptors scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe1]- and [¹²³I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. **Eur. J. Nucl. Med.** 1993;20:716-731.
- Krulich L, Dhariwal APS, McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. **Endocrinology** 1968;83:783-790.
- Kubota A, Yamada Y, Kagimoto S, Yasuda K, Someya Y, Ihara Y, Okamoto Y, Kozasa T, Seino S, Seino Y. Multiple effector coupling of somatostatin receptor subtype SSTR1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1994;204:176-186.

- Kuczynski B, Reo NV. Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. **Neurochem. Res.** 2006;31:639-656.
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. **Brain.** 2002;125:2202-2212.
- Kutzelnigg A, Lassmann H. Cortical lesions and brain atrophy in MS. **J. Neurol. Sci.** 2005;233:55-59.
- Kwak B, Mullhaupt F, Myit S, Mach F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nat. Med.** 2000;6:1399-1402.
- Lachowicz A, Pawlikowski M, Ochedalski T. Somatostatin-14 increases the inositol-1,4,5-trisphosphate content in various areas of the brain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1994;203(1):379-384.
- Lafaille JJ, Keere FV, Hsu AL, Baron JL, Haas W, Raine CS, Tonegawa S. Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. **J. Exp. Med.** 1997;186(2):307-312.
- Lamberts SWJ, Krenning EP, Reubi JC. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumours. **Endocrin. Rev.** 1991;12:450-482.
- Lamberts SWJ, Van der Lely A-J, de Herder WW. Drug therapy: Octreotide. **N. Eng. J. Med.** 1996;334:246-254.
- Langemann H, Kabiersch A, Newcombe J. Measurement of low-molecular-weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. **Eur. Neurol.** 1992;32:248-252.
- Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. **J. Endocrinol.** 2005;186(3):457-465.
- Lassmann H, Kitz K, Wisniewski HM. Structural variability of demyelinating lesions in different models of subacute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. **Acta Neuropathol. (Berl).** 1980;51(3):191-201.
- Lassmann H. Comparative Neuropathology of Chronic Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. Springer-Verlag eds. 1983. p. 1-122.
- Law SF, Reisine T. Agonist binding to rat brain somatostatin receptors alters the interaction of the receptors with guanine nucleotide-binding regulatory proteins. **Mol. Pharmacol.** 1992;42:398-402.
- Leary SM, Miller DH, Stevenson VL, Brex PA, Chard DT, Thompson AJ. Interferon beta-1a in primary progressive MS: an exploratory, randomized, controlled trial. **Neurology.** 2003;60(1):44-51.
- Legler DF, Doucey MC, Cerottini JC, Bron C, Luescher IF. Selective inhibition of CTL activation by a dipalmitoyl-phospholipid that prevents the recruitment of signaling molecules to lipid rafts. **FASEB J.** 2001;15(9):1601-1603.
- Lehmann D, Karussis D, Misrachi-Koll R. Oral administration of the oxidant-scavenger N-acetyl-L-cysteine inhibits acute experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neurol.** 1994;50:35-42.
- Lenz DC, Wolf NA, Swanborg RH. Strain variation in autoimmunity: attempted tolerization of DA rats results in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.** 1999;163(4):1763-1768.



- Leppert D, Waubant E, Galardy R.T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. **J. Immunol.** 1995;154:4379-4389.
- Leppert D, Waubant E, Bürk MR, Oksenberg JR, Hauser SL. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. **Ann. Neurol.** 1996;40(6):846-852.
- Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. **Exp. Neurol.** 1999;160:33-337.
- Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. **Trends. Neurosci.** 2001;24:39-47.
- Levite M, Cahalon L, HersHKovitz R, Steinman L, Lider O Neuropeptides, via specific receptors regulate T cell adhesion to fibronectin. **J. Immunol.** 1998;160:993-1000.
- Lewis D, Weight F, Luini A. A guanine-nucleotide binding protein mediating the inhibition of voltage dependent calcium current by somatostatin in a pituitary cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1986;83:9035-9039.
- Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 2005;102: 9936-9941.
- Li Y, Descorbeth M, Anand-Srivastava MB. Role of oxidative stress in high glucose-induced decreased expression of G α proteins and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 2008;294(6):H2845-H2854.
- Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor mediated mechanisms of tissue protection. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1995;41:775-787.
- Linington C, Lassmann H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). **J. Neuroimmunol.** 1987;17(1):61-69.
- Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. **Am. J. Pathol.** 2001;158:2057-2066.
- Lombardi MS, Kavelaars A, Schedlowski M, Bijlsma JW, Okihara KL, Van de Pol M, Ochsmann S, Pawlak C, Schmidt RE, Heijnen CJ. Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. **FASEB J.** 1999;13(6):715-725.
- Lombardi MS, Kavelaars A, Heijnen CJ. Role and modulation of G protein-coupled receptor signaling in inflammatory processes. **Crit. Rev. Immunol.** 2002;22(2):141-163.
- Lopez F, Esteve JP, Buscail L, Delesque N, Saint-Laurent N, Theveniau M, Nahmias C, Vaysse N, Susini C. The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signalling. **J. Biol. Chem.** 1997;272:24448-24454.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 1951;193:265-275.

- Lucey MR, Yamada T. Biochemistry and physiology of gastrointestinal somatostatin. **Digestive Diseases and Science**. 1989; 34:5S-13S.
- Luini A, De Matteis MA. Evidence that receptor-linked G protein inhibits exocytosis by a post-second-messenger mechanism in AtT-20 cells. **J. Neurochem**. 1990;54(1):30-38.
- Lumsden CE. The neuropathology of multiple sclerosis. En: Handbook of clinical neurology. Elsevier. Vinken PJ, Bruyn GW eds. 1970. p. 217- 309.
- Lyons JA, Ramsbottom MJ, Cross AH. Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. **Eur. J. Immunol**. 2002;32(7):1905-1913.
- Maatta JA, Kaldman MS, Sakoda S, Salmi AA, Hinkkanen AE. Encephalitogenicity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase for BALB/c and SJL mice. **Immunology**. 1998;95(3):383-388.
- Maeba R, Sawada Y, Shimasaki H, Takahashi I, Ueta N. Ethanolamine plasmalogens protect cholesterol-rich liposomal membranes from oxidation caused by free radicals. **Chem. Phys. Lipids**. 2002;120(1-2):145-151.
- Maeba R, Ueta N. Ethanolamine plasmalogen and cholesterol reduce the total membrane oxidizability measured by the oxygen uptake method. **Biophys. Biochem. Res. Commun**. 2003a;302(2):265-270.
- Maeba R, Ueta N. Ethanolamine plasmalogens prevent the oxidation of cholesterol by reducing the oxidizability of cholesterol in phospholipid bilayers. **J. Lipid Res**. 2003b;44(1):164-171.
- Maeba R, Ueta N. A novel antioxidant action of ethanolamine plasmalogens in lowering the oxidizability of membranes. **Biochem. Soc. Trans**. 2004;32(Pt. 1):141-143.
- Maeda K, Yasuda M, Kaneda H, Maeda S, Yamadori A. Cerebrospinal fluid (CSF) neuropeptide Y- and somatostatina-like immunoreactivities in man. **Neuropeptides** 1994;27:323-332.
- Malfitano A M, Matarese G, Pisanti S, Grimaldi C, Laezza C, Bisogno T, Di-Marzo V, Lechler RI, Bifulco M. Avani inhibits T lymphocyte activation and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol** 2006;171:110-119.
- Malm D, Giaever A, Vonen B, Burhol PG, Florholmen J. Somatostatin inhibition of phospholipase C activity in isolated rat pancreatic islets. **Acta Physiol. Scand**. 1991;143(4):413-419.
- Mamet J, Baron A, Lazdunski M, Voilley N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. **J. Neurosci**. 2002;22(24):10662-10670.
- Markowitz CE. Interferon-beta: mechanism of action and dosing issues. **Neurology**. 2007;68(24 Suppl 4):S8-S11.
- Marshall DL, De Micheli E, Bogdanov MB, Wurtman RJ. Effects of ethanolamine (Etn) administration on Etn and choline (Ch) levels in plasma, brain extracellular fluid (ECF) and brain tissue, and on brain phospholipid levels in rats: an in vivo study. **Neurosci. Res. Commun**. 1996;18(2):87-96.
- Martin, R., McFarland, H.F., McFarlin, D.E. Immunological aspects of demyelinating diseases. **Ann. Rev. Immunol**. 1992;10:153-187.
- Martinez V, Curi AP, Torkian B, Schaeffer JM, Wilkinson HA, Walsh JH, Tache Y. High basal gastric acid secretion in somatostatin receptor subtype 2 knockout mice. **Gastroenterology** 1998;114:1125-1132.



- Mason D, MacPhee I, Antoni F. The role of the neuroendocrine system in determining genetic susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in the rat. **Immunology**. 1990;70(1):1-5.
- Massarelli AC, Dainous F, Hoffmann D, Mykita S, Freysz L, Dreyfus H, Massarelli R. Uptake of ethanolamine in neuronal and glial cell cultures. **Neurochem. Res.** 1986;11(1):29-36.
- Matsumoto Y, Kawai K, Tomita Y, Fujiwara M. Limiting dilution analysis of the frequency of myelin basic protein-reactive T-cells in Lewis, PVG/c and BN rats. Implication for susceptibility to autoimmune encephalomyelitis. **Immunology** 1990;69:215-221.
- Matsuoka N, Yamazaki M, Yamaguchi I. Changes in brain somatostatin in memory deficient rats: comparison with cholinergic markers. **Neurosci.** 1995;66(3):617-626.
- Matsuoka I, Suzuki Y, Defer N, Nakanishi H, Hanoune J. Differential expression of type I, II, and V adenylyl cyclase gene in the postnatal developing rat brain. **J. Neurochem.** 1997;68(2):498-506.
- Matucci-Cerinic M, Borrelli F, Generini S, Cantelmo A, Marcucci I, Martelli F, Romagnoli P, Bacci S, Conz A, Marinelli P, Marabini S. Somatostatin-induced modulation of inflammation in experimental arthritis. **Arthritis Rheum.** 1995;38:1687.
- Matute C, Sanchez-Gomez MV, Martinez Millan L. Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1997;94:8830-8835.
- Matozaki T, Sakamoto C, Nagao M, Baba S. horbol ester or diacylglycerol modulates somatostatin binding to its receptors on rat pancreatic acinar cell membranes. **J. Biol. Chem.** 1986;261(3):1414-1420.
- McDonald JW, Althomsons SP, Hirc KL. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. **Nat. Med.** 1998;4:291-297.
- McDonnell GV, Hawkins SA. Primary progressive increasing clarity but many unanswered questions. **J. Neurol. Sci.** 2002;199:1-15.
- Meissner WW. Hippocampal functions in learning. **J. Psychiat. Res.** 1966;4(4):23-304.
- Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. **Eur. J. Immunol.** 1995;25(7):1951-1959.
- Menendez-Iglesias B, Cerase J, Ceracchini C, Levi G, Aloisi F. Analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands in cultured mouse microglia: upregulation by interferon-g and lipopolysaccharide and downregulation by interleukin-10, prostaglandin E2 and cyclic AMP-elevating agents. **J. Neuroimmunol.** 1997;72:83-93.
- Mengod G, Rigo M, Savasta M, Probst A, Palacios JM. Regional distribution of neuropeptide somatostatin gene expresión in the human brain. **Synapse** 1992; 12:62-74.
- Merril JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. **J. Immunol.** 1993;151:2132-2141.
- Merril JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. **Trends Neurosci.** 1996;19:331-338.
- Merrill J, Murphy S. Inflammation events at the blood brain barrier; regulation of adhesion molecules, cytokines and chemokines by reactive nitrogen and oxygen species. **Brain Behav. Immun.** 1997;11:245-263.

- Mestre L, Correa F, Docagne F, Clemente D, Ortega-Gutierrez S, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C. El sistema cannabinoide en situaciones de neuroinflamación: perspectivas terapéuticas en la esclerosis múltiple. **Rev. Neurol.** 2006;43(9):541-548.
- Meyerhof W. The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 1998;133:55-108.
- Micera A, De Simone R, Aloe L. Elevated levels of nerve growth factor in the thalamus and spinal cord of rats affected by experimental allergic encephalomyelitis. **Arch. Ital. Biol.** 1995;133(2):131-142.
- Miller SD, Karpus WJ. The immunopathogenesis and regulation of T-cell-mediated demyelinating diseases. **Immunol. Today.** 1994;15(8):356-361.
- Moesgaard B, Petersen G, Jaroszewski JW, Hansen HS. Age dependent accumulation of N-acyl-ethanolamine phospholipids in ischemic rat brain. A (31)P NMR and enzyme activity study. **J. Lipid. Res.** 2000;41(6):985-990.
- Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. Effect of endotoxin and interleukin-1beta on corticotropin-releasing-factor and prostaglandin release by rat brainstem slices. **J. Neuroendocrinol.** 1998;10(6):429-436.
- Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore J, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glial cells. **J. Neurosci.** 2003;23:6470-6474.
- Moller, LN, Stidsen, CE, Hartmann, B, Holst, JJ. Somatostatin receptors. **Biochim et Biophys. Acta** 2003;1616:1-84.
- Montalban X. Overview of European pilot study of interferon beta-1b in primary progressive multiple sclerosis. **Mult Scler.** 2004;10 Suppl 1:S62; discussion 62-64.
- Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G, Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1986;83(18):6682-6686.
- Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. **Trends Neurosci.** 1990;13(5):184-188.
- Mons N, Yoshimura M, Cooper DM. Discrete expression of Ca²⁺/calmodulin-sensitive and Ca(2+)-insensitive adenylyl cyclases in the rat brain. **Synapse.** 1993;14(1):51-59.
- Mori A, Aihara M, Shimizu K. Differential expression of somatostatin receptors in the rat eye-SSTR4 is intensely expressed in the iris/ciliary body. **Neurosci. Lett.** 1997;223:185-188.
- Morris-Downes MM, McCormack K, Baker D, Sivaprasad D, Natkunarajah J, Amor S. Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein (OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL mice. **J. Neuroimmunol.** 2002;122(1-2):20-33.
- Muhvic D, Radosevic-Stasic B, Pugel E, Rukavina D, Sepcic J, Efendic S. Modulation of experimental allergic encephalomyelitis by somatostatin. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1992;650:170.



- Muñoz-Acedo G, Izquierdo-Claros RM, Sánchez-Alonso JA, del Hoyo N, Pérez-Albarsanz MA, Arilla E. Effect of somatostatin on the mass accumulation of inositol-1,4,5-trisphosphate in rat hypothalamus, striatum, frontoparietal cortex and hippocampus. **Neurosci. Lett.** 1995;197(1):41-44.
- Muscettola G, Grasso G. Somatostatin and vasoactive intestinal peptide reduce interleukin gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunobiology.* 1990;180:419-430.
- Myers KJ, Sprent JP, Dougherty JP and Ron Y. Synergy between encephalitogenic T cells and myelin basic protein-specific antibodies in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol** 1992;41:1-8.
- Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. **J. Neurosci.** 1999;19(8):2987-2995.
- Naidoo R, Knapp ML. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. **Clin. Chem.** 1992;38:2449-2454.
- Nakamura H, Koike T, Hiruma K, Sato T, Tomioka H, Yoshida S. Identification of lymphoid cell lines bearing receptors for somatostatin. **Immunology** 1987;62:655-658.
- Natarajan V, Schmid PC, Schmid HH. N-acyl ethanolamine phospholipid metabolism in normal and ischemic rat brain. **Biochim. Biophys. Acta.** 1986;878(1):32-41.
- Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. **J. Neurosci. Res.** 1996;45(4):322-333.
- Neuhaus O, Archelos JJ, Hartung HP. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. **Trends Pharmacol. Sci.** 2003;24(3):131-138.
- Newman JL, Stiers DL, Anderson WH, Schmid HH. Phase behavior of synthetic N-acyl ethanolamine phospholipids. **Chem. Phys. Lipids.** 1986;42(4):249-260.
- Nicoletti F, Patti F, Nicoletti A, L'Espiscope MR, DiMarco R, Bendtzen K, Reggio A. Sodium fusidate in steroid resistant relapses of multiple sclerosis. **Mult. Scler.** 1999;5:377.
- Nieper HA, Kholer L. Investigation of Potassium and Magnesium 2-Aminoethylphosphate. **Ärztl Forsch** 1962;16:641.
- Nieper HA. A clinical study of the calcium transport substances Ca 1-d1 aspartate and Ca 2-aminoethanol phosphate as potent agents against autoimmunity and other anticytological aggressions. 2nd communication. **Agressology.** 1967; 8(4):395-406.
- Nieper HA. A comparative study of the clinical effect of Ca-1-d1-aspartate (Calciretard), of Ca-2-aminoethanol phosphate (Ca-PEA) and of the cortisones. **Agressology.** 1968; 9(3):471-475.
- Nieper HA. The Nieper regimen for the treatment of multiple sclerosis. **The Brever Science Library.** 1994.
- Noda M, Nakanishi H, Akaike N. Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-peptide. **Neurosci.** 1999;92:1465-1474.
- Nordlind K, Mutt V. Modulating effect of β -endorphin, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal peptide on the proliferative response of peripheral blood T lymphocytes of nickel-allergic patients to nickel sulphate. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** 1985;81:368-374.

- Noseworthy J. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. **Nature** 1999;399: SuplA40-A47.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M. Multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.** 2000;343:938-952.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. **J. Biol. Chem.** 2001;276(22):19452-19460.
- O'Carroll AM, Lolait SJ, König M, Mahan LC. Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin: 28. **Mol. Pharmacol.** 1993 Dec;44(6):1278
- Oderfeld-Nowak B, Zaremba M, Micera A, Aloe L. The upregulation of nerve growth factor receptors in reactive astrocytes of rat spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Neurosci Lett.** 2001;308(3):165-168.
- Oleszak EL, Zaczynska E, Bhattacharjee M, Butunoi C, Legido A, Katsetos CD. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/ macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 1998;5:438-445.
- Oomen SP, Hofland LJ, Lamberts SW, Löwenberg B, Touw IP. Internalization-defective mutants of somatostatin receptor subtype 2 exert normal signaling functions in hematopoietic cells. **FEBS Lett.** 2001;503(2-3):163-167.
- Ortega-Gutierrez S, Molina-Holgado E, Arévalo-Martin A, Viso A, Lopez-Rodriguez ML, Guaza C. Endocannabinoids uptake inhibition as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis. **FASEB J.** 2005b;19:1338-1344.
- Ortega-Gutierrez S, Molina-Holgado E, Guaza C. Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. **J. Neurosci. Res.** 2005a;52:166-168.
- Osborne R, Tashjian AH Jr. Modulation of peptide binding to specific receptors on rat pituitary cells by tumor-promoting phorbol esters: decreased binding of thyrotropin-releasing hormone and somatostatin as well as epidermal growth factor. **Cancer Res.** 1982;42(11):4375-4381.
- Palinski W. Immunomodulation: a new role for statins? **Nat. Med.** 2000;6(12):1311-1312.
- Pan MG, Florio T, Stork PJ. G protein activation of a hormone-stimulated phosphatase in human tumor cells. **Science.** 1992;256(5060):1215-1217.
- Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with g interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. **Neurology** 1987;37:1097-1102.
- Parvaneh Tafreshi A. Nerve growth factor prevents demyelination, cell death and progression of the disease in experimental allergic encephalomyelitis. **Iran J. Allergy Asthma Immunol.** 2006;5(4):177-181.
- Patel YC, Reichlin S. Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. **Endocrinology** 1978;102:523-530.
- Patel YC. General aspects of the biology and function of somatostatin. Weil C, Müller EE, Thorner MO, eds. En: Basic and Clinical Aspects of Neuroscience. Berlin. Springer-Verlag; 1992. pp: 1-16.



- Patel YC, Greenwood MT, Kent G, Panetta R, Srikant CB. Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: Tissue selective distribution and cAMP regulation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1993;192:288-294.
- Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB. All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1994;198:605-612.
- Patel YC, Galanopoulou A. Processing and intracellular targeting of prosomatostatin-derived peptides: the role of mammalian endoproteases. **Ciba Found Symp.** 1995;190:26-40; discussion 40-50.
- Patel YC, Srikant CB. Somatostatin receptors. **Trends Endocrinol. Metab.** 1997;8:398-405.
- Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchysyn L, Niznik H, Srikant CB. The somatostatin receptor family. **Life Sci.** 1999;57:1249-1265.
- Patel YC. Somatostatin and its receptor family. **Front. Neuroendocrinol.** 1999;20:157-198.
- Payan DG, Hess CA, Goetzl EJ. Inhibition by somatostatin of the proliferation of T lymphocytes and Molt-4 lymphoblasts. **Cell. Immunol.** 1984;84:433-438.
- Pelletier G, Leclerc R, Dube D, Abrie F, Puviani R, Arimura A, Schally AV. Localization of growth hormone release hormone (somatostatin) in the rat brain. **Am. J. Anat.** 1975;142:397-401.
- Peluso G, Petillo O, Melone MA, Mazzarella G, Ranieri M, Tajana GF. Modulation of cytokine production in activated human monocytes by somatostatin. **Neuropeptides**, 1996;36(5):443-451.
- Pender MP. Demyelination and neurological signs in experimental allergic encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol.** 1987;15(1):11-24.
- Pender MP, Nguyen KB, McCombe PA, Kerr JF. Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. **J Neurol Sci.** 1991;104(1):81-87.
- Pender MP, Tabi Z, Nguyen KB, McCombe PA. The proximal peripheral nervous system is a major site of demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in the Lewis rat by a myelin basic protein-specific T cell clone. **Acta Neuropathol. (Berl).** 1995;89(6):527-531.
- Penn RB, Pronin AN, Benovic JL. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. **Trends Cardiovasc. Med.** 2000;10(2):81-89.
- Perez J, Rigo M, Kaupmann K, Bruns C, Yasuda K, Bell GI, Lubbert H, Hoyer D. Localization of somatostatin (SRIF) SSTR-1, SSTR-2 and SSTR-3 receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. **Naumyn Schmiedberg's Arch. Pharmacol.** 1994;349:145-160.
- Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp B. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. **Ann Neurol** 2001;50:389-400.
- Piani D, Frei K, Do KQ. Murine macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. **Neurosci. Lett.** 1991;133:159-162.
- Pierson BA, McGlave PB, Hu, WS, Miller JS. Natural killer cell proliferation is dependent on human serum and markedly increased utilizing an enriched supplemented basal medium. **J. Hematother.** 1995;4:149-158.
- Pinto F, Brenner T, Dan P, Krinsky M, Yegar S. Extracellular phospholipase A2 inhibitors suppress central nervous system inflammation. **Glia** 2003;44:275-282.

- Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. **Nat. Med.** 2000;6:67-70.
- Polman CH, Dijkstra CD, Sminia T, Koetsier JC. Immunohistological analysis of macrophages in the central nervous system of Lewis rats with acute experimental allergic encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol.** 1986;11(3):215-222.
- Polman CH, Matthaei I, de Groot CJ, Koetsier JC, Sminia T, Dijkstra CD. Low-dose cyclosporin A induces relapsing remitting experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. **J. Neuroimmunol.** 1988;17(3):209-216.
- Pradayrol L, Jörnvall H, Mutt V, Ribet A. N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. **FEBS Lett.** 1980;109(1):55-58.
- Premont RT, Matsuoka I, Mattei MG, Pouille Y, Defer N, Hanoune J. Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. **J. Biol. Chem.** 1996;271(23):13900-13907.
- Prineas JW. The neuropathology of multiple sclerosis. En: Handbook of clinical neurology. Demyelinating disease, vol 3. Koetsier JC, editor. Amsterdam' Elsevier; 1985. p. 213-257.
- Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJR, Jackson SJ, Croxford, JL, Pocok M. Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. **Brain** 2003;126:2191-2202.
- Puebla L, Arilla-Ferreiro E. Modulation of somatostatin receptors, somatostatin content and Gi proteins by substance P in the rat frontoparietal cortex and hippocampus. **J. Neurochem.** 2003;84(1):145-156.
- Puerta C, Martínez I, Baranda P, Blasco MR, Castejón R, Vargas JA, García-Merino A. Aminoguanidine reduces apoptosis of circulating V Beta 8.2 T lymphocytes in Lewis rats with actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis. Association with persistent inflammation of the central nervous system and lack of recovery. **J. Neuroimmunol.** 2000;110(1-2):140-150.
- Rage F, Rougeot C, Tapia-Arancibia L. GABAA and NMDA receptor activation controls somatostatin messenger RNA expression in primary cultures of hypothalamic neurons. **Neuroendocrinology.** 1994;60(5):470-476.
- Raine CS, Field EJ. Nuclear structures in nerve cells in multiple sclerosis. **Brain Res.** 1968;10:266-268.
- Raine CS, Traugott U, Farooq M, Bornstein MB, Norton WT. Augmentation of immune-mediated demyelination by lipid haptens. **Lab Invest.** 1981;45(2):174-182.
- Raine CS. Biology of disease. Analysis of autoimmune demyelination: its impact upon multiple sclerosis. **Lab. Invest.** 1984;50(6):608-635.
- Raine CS. Demyelinating diseases. In: RL Davis and DM Robertos (eds). Textbook of neuropathology. 1985. Williams and Wilkins, Baltimore MD. Pp. 535-552.
- Raine CS, Cross AH. Axonal dystrophy as a consequence of long-term demyelination. **Lab. Invest.** 1989;60(5):714-725.
- Raine CS. Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 1994;53(4):328-337.
- Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP. Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. **Ann. Neurol.** 1999;46(2):144-160.



- Ramos-Ruiz R, Penela P, Penn RB, Mayor F Jr. Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. **Circulation.** 2000;101(17):2083-2089.
- Rauly I, Saint-Laurent N, Delesque N, Buscail L, Esteve JP, Vaysse N, Susini C. Induction of a negative autocrine loop by expression of sst2 somatostatin receptor in NIH 3T3 cells. **J. Clin. Invest.** 1996;97:1874-1883.
- Raynor K, Reisine T. Somatostatin receptors. **Crit. Rev. Neurobiol.** 1992;6(4):273-289.
- Raynor K, Murphy WA, Coy DH, Taylor JE, Moreau J-P, Yasuda K, Bell GI, Reisine T. Cloned somatostatin receptors: identification of subtype selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides. **Mol. Pharmacol.** 1993a;43:838-844.
- Raynor K, O'Carroll AM, Kong H, Yasuda K, Mahan LC, Bell GI, Reisine T. Characterization of cloned somatostatin receptors SSTR4 and SSTR5. **Mol. Pharmacol.** 1993b;44:385-392.
- Reardon DB, Wood SL, Brautigan DL, Bell GI, Dent P, Sturgill TW. Activation of a protein tyrosine phosphatase and inactivation of Raf-1 by somatostatin **Biochem. J.** 1996;31:401-404.
- Reardon DB, Dent P, Wood SL, Kong T, Sturgill TW. Activation in vitro of somatostatin receptor subtypes 2, 3, or 4 stimulates protein tyrosine phosphatase activity in membranes from transfected Ras-transformed NIH 3T3 cells: coexpression with catalytically inactive SHP-2 blocks responsiveness. **Mol. Endocrinol.** 1997;11(8):1062-1069.
- Rees RG, Eckland DJ, Lightman SL, Brewerton DA. The effects of somatostatin analogue, BM23014, on adjuvant arthritis in rats. **Br. J. Rheumatol.** 1989;28(Suppl. 2):40.
- Reichlin S. Somatostatin. *N. Engl. J. Med.* 1983;309:1495-1501.
- Reisine T, Guild S. Pertussis toxin blocks somatostatin inhibition of calcium mobilization and reduces the affinity of somatostatin receptors for agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1985a;235:551-557.
- Reisine T, Zhang Y, Sekura R. Pertussis toxin treatment blocks the inhibition of somatostatin and increases stimulation by forskolin of cAMP accumulation and adrenocorticotropin secretion from mouse anterior pituitary cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1985b;222:275-282.
- Reisine T, Bell GI. Molecular biology of somatostatin receptors. **Endocrin. Rev.** 1995a;16:4274-4242.
- Reisine T, Woulfe D, Raynor K. Interactions of somatostatin receptors with G proteins and cellular effector systems. En: Somatostatin and its receptors. Chichester (Ciba Foundation Symposium) Wiley; 1995b. p. 160-170.
- Reisine T. Somatostatin. **Cell. Mol. Neurobiol.** 1995c;1:597-614.
- Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T. TNF- α expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. **J. Immunol.** 1995;154:944-953.
- Rep MH, Hintzen RQ, Polman CH, van Lier RA. Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. **J. Neuroimmunol.** 1996;67(2):111-118.
- Reubi JC, Perrin MH, Rivier JE, Vale W. High affinity binding sites for a somatostatin₂₈ analog in rat brain. **Life Sci.** 1981;28: 2191-2198.



- Reubi JC, Waser B, Horisberger U, Krenning E, Lamberts SW, Gebbers JO, Gersbach P, Laissue JA. *In vitro* autoradiographic and *in vivo* scintigraphic localization of somatostatin receptors in human lymphatic tissue. **Blood**. 1993a;82:2143-2151.
- Reubi JC, Horisberger U, Waser B, Gebbers JO, Laissue J. Preferential location of somatostatin receptors in germinal centers of human gut lymphoid tissue. **Gastroenterology** 1993b;103:1207-1214.
- Rezek M, Havlicek V, Leybin L, Pinsky C, Kroeger EA, Hughes KR, Friesen H. Neostriatal administration of somatostatin: differential effect of small and large doses on behaviour and motor control. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 1977;55:234-242.
- Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. **J. Biol. Chem.** 1992;267(18):12393-12396.
- Richardson WD. Oligodendrocyte development. En: Jessen KR, Richardson WD, eds. Glial cell development. Oxford, Oxford University Press. 2001. pp.21-54.
- Riechert T, Hassler R, Mundinger F, Bronisch F, Schmidt K. Pathologic-anatomical findings and cerebral localization in stereotactic treatment of extrapyramidal motor disturbances in multiple sclerosis. **Confin Neurol.** 1975;37:24-40.
- Rivero VE, Maccioni M, Bucher AE, Roth GA, Riera CM. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by intraperitoneal administration of soluble myelin antigens in Wistar rats. **J. Neuroimmunol.** 1997;72(1):3-10.
- Rivero VE, Riera CM, Roth GA. Humoral response against myelin antigens in two strains of rats with different susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis (EAE). **Autoimmunity.** 1999;29(2):129-137.
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **J. Exp. Med.** 1933;58:39-53.
- Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. **J. Exp. Med.** 1935;61(5):689-702.
- Roca CA, Su TP, Elpern S, McFarland H, Rubinow DR. Cerebrospinal fluid somatostatin, mood, and cognition in multiple sclerosis. **Biol. Psychiatry** 1999;46:551-556
- Romanic AM, Madri JA. Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. **Brain Pathol.** 1994;4:145-156.
- Roosterman D, Glassmeier G, Baumeister H, Scherulb H, Meyerhof W. A somatostatin receptor 1 selective ligand inhibits Ca^{2+} currents in rat insulinoma 1046-38 cells. **FEBS Lett.** 1998;425:137-140.
- Ross EM. Signal sorting and amplification through G protein-coupled receptors. **Neuron.** 1989;3(2):141-152.
- Rostrom B, Grubb A, Holmdahl R. Oligoclonal IgG bands synthesized in the central nervous system are present in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. **Acta Neurol. Scand.** 2004;109(2):106-112.
- Roth A, Kreienkamp HJ, Nehring RB, Roosterman D, Meyerhof W, Richter D. Endocytosis of the rat somatostatin receptors-subtype discrimination, ligand specificity and delineation of carboxyterminal positive and negative sequence motifs. **DNA Cell Biol.** 1997;16:111-119.



- Roth MP, Viratelle C, Dolbois L, Delverdier M, Borot N, Pelletier L, Druet P, Clanet M, Coppin H. A genome-wide search identifies two susceptibility loci for experimental autoimmune encephalomyelitis on rat chromosomes 4 and 10. **J. Immunol.** 1999;162(4):1917-1922.
- Rubinow DR, Davis CL, Post RM. Somatostatin in the central nervous system. Bloom FE, Kupfer DJ, eds. En: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. New York. Raven Press, Ltd.; 1995. p. 553-562.
- Rumbach L, Racadot E, Armspach JP, Namer IJ, Bonneville JF, Wijdenes J, Marescaux C, Biological assessment and MRI monitoring of the therapeutic efficacy of a monoclonal anti-T CD4 antibody in multiple sclerosis patients. **Mult. Scler.** 1996;1:207-212.
- Sacerdote P, Bianchi M, Panerai AE. Human monocyte chemotactic activity of calcitonin and somatostatin related peptides: modulation by chronic peptide treatment. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.** 1990;70:141.
- Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, Matarese G. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. **J. Clin. Invest.** 2003;111(2):241-250.
- Salin P, Mercugliano M, Chesselet MF. Differential effects of chronic treatment with haloperidol and clozapine on the levels of preprosomatostatin mRNA in the striatum nucleus accumbens and frontal cortex of the rat. **Cell. Mol. Neurobiol.** 1990 ;10:127-144.
- Satoh J, Lee YB, Kim SU. T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture. **Brain Res.** 1995;704:92-96.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chem. Res. Toxicol.** 2008;21(1):172-188.
- Scheel-Kruger J. GABA in the striatonigral and striatopallidal systems as moderator and mediator of striatal functions. **Adv. Neurol.** 1984;40:85-90.
- Schindler M, Humphrey PPA, Emson PC. Immunohistochemical localization of the somatostatin sst2(A) receptor in the rat brain and spinal cord. **Neuroscience** 1997a; 76:225-240.
- Schindler M, Sellers LA, Humphrey PPA, Emson PC. Immunohistochemical localization of the somatostatin sst2(a) receptor in the rat brain and spinal cord. **Neuroscience** 1997b;76:225-240.
- Schindler M, Kidd EJ, Carruthers AM, Wyatt MA, Jarvie EM, Sellers LA, Feniuk W, Humphrey PP. Molecular cloning and functional characterization of a rat somatostatin sst2(b) receptor splice variant. **Br. J. Pharmacol.** 1998;125(1):209-217.
- Schluesener HJ, Sobel RA, Linington C, Weiner HL. A monoclonal antibody against a myelin oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease. **J. Immunol.** 1987;139(12):4016-4021.
- Schmied M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H, Lassmann H. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. **Am J Pathol.** 1993;143(2):446-452.
- Schonbrunn A, Tashjian AHJr. Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. **J. Biol. Chem.** 1978;253:6473-6483.

- Schonbrunn A, Tashjian AH Jr. Modulation of somatostatin receptors by thyrotropin-releasing hormone in a clonal pituitary cell strain. **J. Biol. Chem.** 1980;255(1):190-198.
- Schremmer JM, Blank ML, Wykle RL. Bradykinin-stimulated release of [³H]arachidonic acid from phospholipids of HSDM1C1 cells: comparison of diacyl phospholipids and plasmalogens as sources of prostaglandin precursors. **Prostaglandins** 1979;18(4):491-505.
- Schwarz H, Blanco FJ and Lotz M. Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. **J Neuroimmunol** 1994;55:107-115.
- Schweitzer P, Madamba S, Siggins GR. Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. **Nature.** 1990;346(6283):464-467.
- Sicchitano R, Dazin P, Bienenstock H, Payan DG, Stanisz AM. Distribution of somatostatin receptors on murine spleen and Peyer's patch T and B lymphocytes. **Brain Behav. Immunol.** 1987;1:173-184.
- Sicchitano R, Dazin P, Bienenstock H, Payan DG, Stanisz AM. The murine IgA-secreting plasmacytoma MOPC-315 expresses somatostatin receptors. **J. Immunol.** 1988;141:937-941.
- Scolnik MP, Palacios MF, Intebi AD, Diez RA. Octreotide inhibits in vitro B cell differentiation to plasma cell induced by PWM. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.** 1996;9:119-122.
- Sedqi M, Roy S, Mohanraj D, Ramakrishnan S, Loh HH. Activation of rat thymocytes selectively upregulates the expression of somatostatin receptor subtype-1. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 1996;38(1):103-112.
- Selmaj K, Raine CS, Cross AH. Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. **Ann. Neurol.** 1991;30:694-700.
- Sethna MP, Lampson LA. Immune modulation within the brain: recruitment of inflammatory cells and increased major histocompatibility antigen expression following intracerebral injection of interferon-g. **J. Neuroimmunol.** 1991;34:121-132.
- Sharma K, Patel YC, Srikant CB. Subtype selective induction of p53-dependent apoptosis but not cell cycle arrest by human somatostatin receptor 3. **Mol. Endocrinol.** 1996;10:1688-1696.
- Sharma K, Srikant CB. Induction of wild type p53, bax and acidic endonuclease during somatostatin signalled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. **Int. J. Cancer** 1998;76:29-66.
- Sharma K, Patel YC, Srikant CB. C-terminal region of human somatostatin receptor is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest. **Mol. Endocrinol.** 1999;13:82-90.
- Sheltawy A, Dawson RM. The polyphosphoinositides and other lipids of peripheral nerves. **Biochem. J.** 1966;100(1):12-18.
- Shi D, Nikodijevic O, Jacobson KA, Daly JW. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. **Cell. Mol. Neurobiol.** 1993;13:247-261.
- Shin T. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in astrocytes and macrophages in the spinal cord of Lewis rats with autoimmune encephalomyelitis. **J. Vet. Sci.** 2001;2(3):195-199.
- Siggins GR, Henriksen SJ, Chavkin C, Gruol D. Opioid peptides and epileptogenesis in the limbic system: cellular mechanisms. **Adv Neurol.** 1986;44:501-512.



- Silva HT Jr, Morris RE. Leflunomide and malononitrilamides. **Am. J. Med. Sci.** 1997;313:289-301.
- Simmons RD, Bernard CC, Singer G, Carnegie PR. Experimental autoimmune encephalomyelitis. An anatomically-based explanation of clinical progression in rodents. **J. Neuroimmunol.** 1982;3(4):307-318.
- Simmons RD, Willenborg DO. Direct injection of cytokines into the spinal cord causes autoimmune encephalomyelitis-like inflammation. **J. Neurol. Sci.** 1990;100:37-42.
- Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA. Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. **Neurosci. Lett.** 2000 Jan;278(3):157-160.
- Smalley KS, Feniuk W, Humphrey PP. Differential agonist activity of somatostatin and L-362855 at human recombinant sst4 receptors. **Br. J. Pharmacol.** 1998;125(4):833-841.
- Smith ME. Lipid biosynthesis in the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. **J. Neurochem.** 1964;11:29-37.
- Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. **Brain Pathol.** 1999; 9:69-92.
- Smith T, Groom A, Zhu B. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. **Nat. Med.** 2000;6:62-66.
- Soos JM, Szente BE. Type I interferons [IFN α , β , δ , κ , ω , τ , IL-28A (IFN λ 2) IL-28B (IFN λ 3) and IL-29 (IFN λ 1)] En: The cytokine handbook. 2003, pp. 549-566
- Sreedharan SP, Kodama KT, Peterson KE, Goetzl EJ. Distinct subsets of somatostatin receptors on cultures human lymphocytes. **J. Biol. Chem.** 1989;264:949-952.
- Srikant CB, Patel YC. Somatostatin receptors: identification and characterization in rat brain membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1981;78(6):3930-3934.
- Srikant CB. Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201-995 in AtT-20 mouse pituitary tumour cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1995;209:400-407.
- Stanisz AM, Befus D, Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. **J. Immunol.** 1986;136:152-156.
- Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the entral nervous system. **Cell** 1996;85:299-302.
- Steinman L. Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. **Neuron.** 1999;24(3):511-514.
- Steinman L, Martin R, Bernard A, Conlon P, Okseberg JR. Multiple sclerosis deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. **Ann. Rev. Neurosci.** 2002;25:491-505.
- Stepaniak JA, Wolf NA, Sun D, Swanborg RH. Interstrain variability of autoimmune encephalomyelitis in rats: multiple encephalitogenic myelin basic protein epitopes for DA rats. **J. Neuroimmunol.** 1997;78(1-2):79-85.

- Sternberg EM, Young WS 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1989;86(12):4771-4775.
- Sternberg EM, Wilder RL, Gold PW, Chrousos GP. A defect in the central component of the immune system--hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback loop is associated with susceptibility to experimental arthritis and other inflammatory diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1990;594:289-292.
- Stevens DB, Chen K, Seitz RS, Sercarz EE, Bronstein JM. Oligodendrocyte-specific protein peptides induce experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. **J. Immunol.** 1999;162(12):7501-7509.
- Stinissen P, Zhang J, Vandevyver C, Hermans G, Raus J. Gammadelta T cell responses to activated T cells in multiple sclerosis patients induced by T cell vaccination. **J. Neuroimmunol.** 1998;87(1-2):94-104.
- Storch MK, Piddlesden SJ, Haltia M: Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. **Ann Neurol** 1998;43:465-471.
- Stout RD, Suttles J. T cell-macrophage cognate interaction in the activation of macrophage effector function by Th2 cells. **J. Immunol.** 1993;150:5330-5337.
- Stower JF, Pleines UE, Morganti-Kossmann MC. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. **Eur. J. Clin. Invest.** 1997;27:1038-1043.
- Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR. The family of G protein coupled receptors. **FASEB J.** 1995;9:745-754.
- Strnad J, Eppler CM, Corbett M, Hadcock JR. The rat SSTR2 somatostatin receptor subtype is coupled to inhibition of cyclic AMP accumulation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1993;191:968-976.
- Stroh T, Kreienkamp HJ, Beaudet A. Immunohistochemical distribution of the somatostatin receptor subtype 5 in the adult rat brain: predominant expression in the basal forebrain. **J. Comp. Neurol.** 1999;412(1):69-82.
- Stübgen JP. Recombinant interferon-beta therapy and neuromuscular disorders. **J. Neuroimmunol.** 2009;212(1-2):132-141.
- Stuve O, Chabot S, Jung SS, Williams G, Yong VW. Chemokine-enhanced migration of human peripheral blood mononuclear cells is antagonized by interferon beta-1b through an effect on matrix metalloproteinase-9. **J. Neuroimmunol.** 1997;80(1-2):38-46.
- Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Cocleclough C, Wekerle H, Raine CS. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. **J. Immunol.** 2001;166(12):7579-7587.
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1996;36:461-480.
- Sunahara RK, Taussig R. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. **Mol. Interv.** 2002;2(3):168-184.
- Suzumura A, Silberberg DH. Expression of H-2 antigen on oligodendrocytes is induced by soluble factors from concanavalin A activated T cells. **Brain Res.** 1985;336:171-175.



- Suzumura A, Mezitis SG, Gonatas NK, Silberberg DH. MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain: induction of Ia antigen expression by gamma-interferon. **J. Neuroimmunol.** 1987;15(3):263-278.
- Szolcsanyi J, Helyes Z, Oroszi G, Nemeth J, Pinter E. Release of somatostatin and its role in the mediation of anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of the rat sciatic nerve. **Br. J. Pharmacol.** 1998a;123:936.
- Szolcsanyi J, Pinter E, Helyes Z, Oroszi G, Nemeth J. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. **Br. J. Pharmacol.** 1998b;125:916.
- Takeda J, Yamagata K, Le Beau MM, Bell GI. Localization of human somatostatin receptor 5 gene (SSTR5) to chromosome band 16p 13.3 by fluorescence in situ hybridization. **Genomics** 1995;26:638-639.
- Takeba Y, Suzuki N, Takeno M, Asai T, Tsuboi S, Hoshino T, Sakane T. Modulation of synovial cell function by somatostatin in patients with reumathoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 1997;40:2128-2138.
- Tallent M, Liapakis G, O'Carroll AM, Lolait SJ, Dichter M, Reisine T. Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca^{2+} current in the pituitary cell line AtT-20. **Neurosci.** 1996;71:1073-1081.
- Tashev R, Belcheva S, Belcheva I. Differential effects of somatostatin on exploratory behavior after unilateral injections in to rat neostriatum. **Peptides.** 2004;25(1):123-128.
- ten Bokum AM, Lichtenauer-Kaligis EG, Melief MJ, van Koetsveld PM, Bruns C, van Hagen PM, Hofland LJ, Lamberts SW, Hazenberg MP. Somatostatin receptor subtype expression in cells of the rat immune system during adjuvant arthritis. **J. Endocrinol.** 1999;161:167.
- ten Bokum AM, Hofland LJ, van Hagen PM. Somatostatin and somatostatin receptors in the immune system: a review. **Eur. Cyt. Netw.** 2000;11(2):161-176.
- Thangaraju M, Sharma K, Leber B, Andrews DW, Shen SH, Srikant CB. Regulation of acidification and apoptosis by SHP-1 and Bcl-2. **J. Biol. Chem.** 1999;274(41):29549-29557.
- Tomura H, Okajima F, Akbar M, Abdul MM, Sho K, Kondo Y. Transfected human somatostatin receptor type 2, SSTR2, not only inhibits adenylyl cyclase but also stimulates phospholipase C and Ca^{2+} mobilization. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1994;200:986-992.
- Touil T, Deloire-Grassin MS, Vital C, Petry KG, Brochet B. In vivo damage of CNS myelin and axons induced by peroxynitrite. **Neuroreport.** 2001;12: 3637-3644.
- Tran GT, Carter N, Hodgkinson SJ. Mycophenolate mofetil treatment accelerates recovery from experimental allergic encephalomyelitis. **Int. Immunopharmacol.** 2001;1:1709-1723.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.** 1998;338(5):278-285.
- Tsien RW, Bean BP, Hess P, Lansman B, Nilius B, Nowycky M. Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonist. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 1986;18:691-710.



- Tsutsumi S, Schnermann J, Noorbakhsh F, Henry S, Yong VW, Winston BW, Warren K, Power C. A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. **J. Neurosci.** 2004;24(6):1521-1529.
- Tsutsumi A, Takano H, Ichikawa K, Kobayashi S, Koike T. Expression of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in human lymphoid cells. **Cell. Immunol.** 1997;181:44-49.
- Tulipano G, Stumm R, Pfeiffer M, Kreienkamp HJ, Höllt V, Schulz S. Differential beta-arrestin trafficking and endosomal sorting of somatostatin receptor subtypes. **J. Biol. Chem.** 2004;279(20):21374-21382.
- Van den Anker-Lugtenburg PJ, Krenning EP, Oei HY, Van Hagen PM, Gerrits CJ, Reubi JC, Lamberts SW, Lowenberg B. Somatostatin receptor scintigraphy in the initial staging of Hodgkin's disease. **Brit. J. Haematol.** 1996;93:93-99.
- Van der Goes A, Brouwer J, Hoekstra K. Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. **Neuroimmunol.** 1998;92:67-75.
- Van Hagen PM, Krenning EP, Reubi JC, Mulder AH, Bakker WH, Oei HY, Lowenberg B, Lamberts SW. Somatostatin analogue scintigraphy of malignant lymphomas. **Brit. J. Haematol.** 1993;83:75-79.
- Van Hagen PM, Markusse HM, Lamberts SW, Kwekkeboom DJ, Reubi JC, Krenning EP. Somatostatin receptor imaging. The presence of somatostatin receptors in rheumatoid arthritis. **Arthr. Rheum.** 1994a;37:1521-1527.
- Van Hagen PM, Krenning EP, Reubi JC, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Mulder AH, Laissue I, Hoogstede HC, Lamberts SW. Somatostatin analogue scintigraphy in granulomatous diseases. **Eur. J. Nucl. Med.** 1994b;21:497-502.
- Van Hagen PM, Hofland LJ, ten Bokum AM, Lichtenauer-Kaligis EGR, Kwekkeboom DJ, Ferone D, Lamberts SWJ. Neuropeptides and their receptors in the immune system. **Ann. Med.** 1999;31(Suppl.2):15-22.
- Van der Veen RC, Hinton DR, Incardonna F, Hofman FM. Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. **J. Neuroimmunol.** 1997;77: 1-7.
- Van Heyningen P, Calver AR, Richardson WD. Control of progenitor cell number by mitogen supply and demand. **Curr. Biol.** 2001;11:232-241.
- Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Höllt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). **FEBS Lett.** 1992;311(3):290-294.
- Vanetti M, Vogt G, Höllt V. The two isoforms of the mouse somatostatin receptor (mSSTR2A and mSSTR2B) differ in coupling efficiency to adenylate cyclase and in agonist-induced receptor desensitization. **FEBS Lett.** 1993;331:260-266.
- Vaudry H, Chartrel N, Conlon JM. Isolation of [PRO2, MET14] somatostatin-14 and somatostatin-28 from the frog brain reveals the existence of a somatostatin gene family in a tetrapod. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1992;188:477-482.
- Vecsei L, Widerlov E, Ekman R, Alling C. Cysteamine and pantethine effects on passive avoidance behaviour, shuttle box learning, open-field activity, striatal catecholamines and somatostatin. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** 1989; 299:14-27.



- Vecsei L, Csala B, Widerlöv E, Ekman R, Czopf J, Pálffy G. Lumbar cerebrospinal fluid concentrations of somatostatina and neuropeptide Y in multiple sclerosis. **Brain Res. Bull.** 1990;25:411-413.
- Vercellino M, Plano F, Votta B, Mutani R, Giordana MT, Cavalla P. 2005. Grey matter pathology in multiple sclerosis. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 2005;64:1101-1107.
- Vidal C, Raully I, Zeggari M, Delesque N, Esteve JP, Saint-Laurent N, Vaysse N, Susini C. Up-regulation of somatostatin receptors by epidermal growth factor and gastrin in pancreatic cancer cells. **Mol Pharmacol.** 1994;46:97-104.
- Vilcaes AA, Degano AL, López PH, Nores GA, Roth GA. Antibodies which block anti-myelin basic protein antibodies associated with development of experimental autoimmune encephalomyelitis in Wistar rats. **J. Neuroimmunol.** 2005;164(1-2):31-36.
- Villarroya H, Marie Y, Ouallet JC, Le Saux F, Tchélingérien JL, Baumann N. Expression of TNF alpha in central neurons of Lewis rat spinal cord after EAE induction. **J Neurosci Res.** 1997;49(5):592-599.
- Viollet C, Vaillard C, Videau C, Bluet-Pajot MT, Ungerer A, L'Heritier A, Kopp C, Potier B, Billard JM, Schaeffer J, Smith RG, Rohrer SP, Wilkinson H, Zheng H, Epelbaum J. Involvement of sst2 somatostatin receptor in locomotor exploratory activity and emocional reactivity in mice. **Eur. J. Neurosci** 2000;12:3761-3770.
- Vladimirova O, Lu FM, Shawver L, Kalman B. The activation of protein kinase C induces higher production of reactive oxygen species by mononuclear cells in patients with multiple sclerosis than in controls. **Inflamm. Res.** 1999;48(7):412-416.
- Vos CM, van Haastert ES, de Groot CJ, van der Valk P, de Vries HE. Matrix metalloproteinase-12 is expressed in phagocytotic macrophages in active multiple sclerosis lesions. **J. Neuroimmunol.** 2003;138:106-114.
- Voorthuis JA, Uitdehaag BM, De Groot CJ, Goede PH, van der Meide PH, Dijkstra CD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-g in Lewis rats. **Clin. Exp. Immunol.** 1990;8:183-188.
- Vroon A, Lombardi MS, Kavelaars A, Heijnen CJ. Changes in the G-protein-coupled receptor desensitization machinery during relapsing-progressive experimental allergic encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol.** 2003;137(1-2):79-86.
- Vroon A, Kavelaars A, Limmroth V, Lombardi MS, Goebel MU, Van Dam AM, Caron MG, Schedlowski M, Heijnen CJ. G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol.** 2005;174(7):4400-4406.
- Waksman BH, Adams RD. A histologic study of the early lesions in experimental allergic encephalomyelitis in the guinea pig and rabbit. **Am. J. Pathol.** 1960;41:135-153.
- Wall MA, Posner BA, Sprang SR. Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. **Structure.** 1998;6(9):1169-1183.

- Wang T, Nagai H, Bouda K, Matsuura S, Takaoka Y, Niwa S, Homma T, Tanaka H, Shudo K. Effect of selective IL-6 inhibitor Am-80 on experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats. **Acta Pharmacol Sin.** 2000;57:1885-1888.
- Wang J, Tsirka S. Contribution of extracellular proteolysis and microglia to intracerebral hemorrhage. **Neurocrit. Care** 2005;3(1):77-85.
- Warren KG, Catz I: A correlation between cerebrospinal fluid myelin basic protein and anti-myelin basic protein in multiple sclerosis patients **Ann Neurol** 1987;21:183-189.
- Warren KG, Catz I. Increased synthetic peptide specificity of tissue-CSF bound anti-MBP in multiple sclerosis. **J. Neuroimmunol.** 1993;43(1-2):87-96.
- Warren KG, Catz I. Relative frequency of autoantibodies to myelin basic protein and proteolipid protein in optic neuritis and multiple sclerosis cerebrospinal fluid. **J. Neurol. Sci.** 1994;121(1):66-73.
- Waubant E. Emerging disease modifying therapies for multiple sclerosis. **Expert. Opin. Emerg Drugs.** 2003;8(1):145-161.
- Waxman SG. Demyelination in spinal cord injury and multiple sclerosis: what can we do to enhance functional recovery. **J. Neurotrauma.** 1992;9(S1):S105-S117.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2003;2(12):999-1017.
- Weerth S, Berger T, Lassmann H, Linington C. Encephalitogenic and neuritogenic T cell responses to the myelin-associated glycoprotein (MAG) in the Lewis rat. **J. Neuroimmunol.** 1999;95(1-2):157-164.
- Weinshenker BG, Bass B, Rice GP: The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. **Brain** 1989;112:133-146.
- Weinstock JV, Blum A, Malloy T. Macrophages within the granulomas of murine schistosomiasis mansoni are a source of a somatostatin 1-14 like molecule. **Cell Immunol** 1990;131:381-388.
- Weinstock JV, Elliott D. The substance P and somatostatin interferon- γ immunoregulatory circuit. **Ann NY Acad Sci** 1998;840:532-539.
- Weinstock JV, Elliot D. The somatostatin immunoregulatory circuit present at sites of chronic inflammation. **Eur. J. Endocrinol.** 2000;143:S15-S19.
- Weiss RE, Reddi AH, Nimni ME. Somatostatin can locally inhibit proliferation and differentiation of cartilage and bone precursor cells. **Calcif. Tissue Int.** 1981;33:425-430.
- Weissert R, Wallstrom E, Storch MK, Stefferl A, Lorentzen J, Lassmann H, Linington C, Olsson T. MHC haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats. **J. Clin. Invest.** 1998;160(2):681-690.
- Weissmann C, Weber H. The interferon genes. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.** 1986;33:251-300.
- Wekerle H, Sun D, Oropeza-Wekerle RL, Meyermann R. Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. **J. Exp. Biol.** 1987;132:43-57.
- Wekerle H. T-cell autoimmunity in the central nervous system. **Intervirol.** 1993; 35:95-100.
- Weller PF. The immunobiology of eosinophils. **N. Engl. J. Med.** 1991;324(16):1110-1118.
- Werner P, Allix M, Pitt D. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocytes and axonal damage. **Ann. Neurol.** 2001;50:169-180.



- Wiedermann C J, Reinisch N, Braunsteiner H. Stimulation of monocyte chemotaxis by human growth hormone and its deactivation by somatostatin. **Blood** 1993;82:954-960
- Willenborg DO and Prowse SJ. Immunoglobulino-deficient rats fail to develop experimental allergic encephalomyelitis. **J Neuroimmunol** 1983;5:99-109.
- Williams K, Ulvestad E, Antel JP. B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ. **Eur. J. Immunol.** 1994;24:3031-3137.
- Winstel R, Freund S, Krasel C, Hoppe E, Lohse MJ. Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1996;93(5):2105-2109.
- Winyard PG, Blake DR. Antioxidants, redox-regulated transcription factors and inflammation. En *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy. Advances in pharmacology.* Siles H, ed. 38, Academic Press, San Diego. 1997. pp 403-421.
- Wisniewski HM, Keith AB. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis - an experimental model of multiple sclerosis. **Ann. Neurol.** 1977;1:144-148.
- Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW. Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. **Nature** 1984;310:688-691.
- Woodruff RH, Frutigger M, Richardson WD, Franklin RJM. Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination. **Mol. Cell. Neurosci.** 2004;25:252-262.
- Wraith DC, McDevitt HO, Steinman L, Acha-Orbea H. T cell recognition as the target for immune intervention in autoimmune disease. **Cell.** 1989;57(5):709-715.
- Wu M, Tsirka SE. Endothelial NOS-deficient mice reveal dual roles for nitric oxide during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Glia.** 2009;57(11):1204-1215.
- Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK, Trapp Bd. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 2002;61(1):23-32.
- Xia Z, Choi EJ, Wang F, Storm DR. The type III calcium/calmodulin-sensitive adenylyl cyclase is not specific to olfactory sensory neurons. **Neurosci. Lett.** 1992;144(1-2):169-173.
- Xia Z, Storm DR. Regulatory properties of the Mammalian Adenylyl Cyclases. BR Landes, Trappe PA eds. 1996.
- Xu Y, Berelowitz M, Bruno JF. Characterization of the promoter region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen-responsiveness. **Mol. Cel. Endocrinol.** 1998;139(1-2):71-77.
- Xu W, Chen H, Du K, Asahara H, Tini M, Emerson BM, Montminy M, Evans RM. A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. **Science.** 2001 ;294(5551):2507-2511.
- Xu ZC, Ling G, Sahr RN, Neal-Beliveau BS. Asymmetrical changes of dopamine receptors in the striatum after unilateral dopamine depletion. **Brain Res.** 2005;1038(2):163-170.



- Yajima Y, Akita Y, Saito T. Pertussis toxin blocks the inhibitory effects of somatostatin on cAMP-independent thyrotropin hormone releasing hormone-stimulated prolactin secretion of GH3 cells. **J. Biol. Chem.** 1986;261:2684-2691.
- Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1992a;89:251-255.
- Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S. Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. **Mol. Endocrinol.** 1992b;6(12):2136-2142.
- Yan S, Li M, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C. TNF- α decreases expression of somatostatin, somatostatin receptors and cortistatin in human coronary endothelial cells. **J. Surg Res.** 2005;123:294-301.
- Yañez J, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. Distribution of somatostatin-immunoreactivity in the brain of the larval lamprey (*petromyzon-marinus*). **J. Chem. Neuroanat.** 1992;5:511-520.
- Yard BA, Yedgar S, Scheele M, Van der Woude D, Beck G, Heidrich B, Krinsky M, Van der Woude FJ, Post S. Modulation of IFN-g-induced immunogenicity by phosphatidylethanolamine-linked hyaluronic acid. **Transplantation** 2002;73:984-992.
- Yasuda K, Rens-Domiano S, Breder CD, Law SF, Saper CB, Reisine T, Bell GI. Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. **J. Biol. Chem.** 1992 Oct 5;267(28):20422-20428.
- Yasuda K, Espinosa R, Davis EM, Le Beau M, Bell GI. Human somatostatin receptor genes: Localization of SSTR5 to human chromosome 20p 11.2. **Genomics** 1993;17:785-786.
- Yatani A, Birnbaumer L, Brown AM. Direct coupling of the somatostatin receptor to potassium channels by a G protein. **Metabolism.** 1990;39(9 Suppl 2):91-95.
- Yoshitomi H, Fujii Y, Miyazaki M, Inagaki N, Seino S. Involvement of MAP kinase and cfos signalling in the inhibition of cell growth by somatostatin. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 1997;35:E769-E774.
- Zagorski T, Dudek I, Berkan L. Superoxide dismutase (SOD-1) activity in erythrocytes of patients with multiple sclerosis. **Neurol. Neurochir. Pol.** 1991;25:725-730
- Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. **Ann. Rev. Immunol.** 1990;8:579-621.
- Zeggari M, Susini C, Viguerie N, Esteve JP, Vaysse N, Ribet A. Tumor promoter inhibition of cellular binding of somatostatin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1985 Apr 30;128(2):850-857.
- Zeis T, Kinter J, Herrero-Herranz E, Weissert R, Schaeren-Wiemers N. Gene expression analysis of normal appearing brain tissue in an animal model for multiple sclerosis revealed grey matter alterations, but only minor white matter changes. **J. Neuroimmunol.** 2008;205(1-2):10-19.
- Zhao C, Fancy SPJ, Kotter MR, Li WW, Franklin RJM. Mechanisms of CNS remyelination - the key to therapeutic advances. **J. Neurol. Sci.** 2005;233:87-91.
- Zhao W, Tilton RG, Corbett JA. Experimental allergic encephalomyelitis in the rat is inhibited by aminoguanidine, an inhibitor of nitric oxide synthase. **J. Neuroimmunol.** 1996;64:123-133.



- Ziehn MO, Avedisian AA, Tiwari-Woodruff S, Voskuhl RR. Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. **Lab Invest.** 2010;90(5):774-786.
- Zhong MC, Cohen L, Meshorer A, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. T-cells specific for soluble recombinant oligodendrocyte-specific protein induce severe clinical experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2(b) and H-2(s) mice. **J. Neuroimmunol.** 2000;105(1):39-45.