

## **DISCUSIÓN**



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

La hipótesis colinérgica de la disfunción geriátrica de los procesos de memoria ha determinado que las aproximaciones farmacológicas para su tratamiento se hayan basado clásicamente en la facilitación de la neurotransmisión colinérgica a diferentes niveles. Sin embargo, no se han obtenido resultados sólidos que sustenten este tipo de abordajes terapéuticos por lo que cada vez es mayor el interés en las farmacoterapias no restringidas a la mejoría de la neurotransmisión colinérgica para restablecer la función cognoscitiva. En 1986 Summers y colaboradores demostraron que una sustancia derivada de la 4-aminopiridina, la 1,2,3,4-tetrahidro-9-aminoacridina (tacrina) era capaz de restablecer las deficiencias cognoscitivas que padecían los enfermos de Alzheimer con una mayor efectividad que otros tratamientos. Esta eficiencia se adscribió inicialmente a sus propiedades como inhibidor de la acetilcolinesterasa. Sin embargo, este compuesto ha demostrado una eficacia clínica mucho mayor que otros anticolinesterásicos que en principio lo son con una mayor potencia, como la fisostigmina. Todo ello sugiere que la gran efectividad que presenta la tacrina podría estar relacionada con una actividad a diversos niveles, que lograra la restauración de diferentes sistemas de neurotransmisión además del colinérgico (Drukarch y cols., 1988).

El objetivo primordial de esta tesis ha sido comprobar la eficacia de la tacrina para mejorar el deterioro cognoscitivo asociado al envejecimiento en modelos de comportamiento y profundizar en el mecanismo íntimo de su efectividad a nivel neuroquímico, determinando la formación de segundos mensajeros acoplados a los adrenoceptores  $\beta$  en una región cerebral íntimamente relacionada con la consolidación de la memoria reciente, como es el hipocampo, comparándola con la corteza cerebral. Como modelo animal se seleccionó la rata adulta por ser el que mejor reproduce las alteraciones cognoscitivas asociadas con el envejecimiento humano (Bartus y Dean, 1987). Por lo tanto, el estudio se ha efectuado en dos cortes transversales de edad con el fin de analizar las respuestas diferenciales entre ellos.

La cuantificación de la alteración de la memoria reciente que se produce durante el envejecimiento y la posible eficacia de la tacrina para mejorarla, se evaluó en un test estándar

de evitación pasiva de un único ensayo que proporciona una medida fiable, reproducible y específica de los procesos de retención sin la aparición de otros factores como la ansiedad o la depresión en el animal, que podrían alterar su respuesta (Bartus y Dean, 1985).

Las determinaciones neuroquímicas se han centrado en la cuantificación de la producción de AMP cíclico acoplada a la activación del adrenoceptor  $\beta$  y las modificaciones de este sistema de transducción asociadas al envejecimiento.

Ello proporciona una aproximación de los cambios funcionales producidos en los diferentes grupos experimentales, puesto que la alteración de la formación, concentración y degradación de neurotransmisores, (Zhou y cols, 1984; Zubenko y cols, 1989) no determina necesariamente una modificación de la respuesta funcional.

Se ha observado una clara diferencia en la latencia de evitación entre el grupo de animales adultos jóvenes y el de 18 meses que recibieron solución salina tras el entrenamiento. La comparación entre grupos reveló que la latencia en los animales de 18 meses era significativamente menor que en los animales jóvenes. El deterioro observado en nuestros experimentos apoya los datos existentes en la bibliografía que establecen de una forma clara que, durante el envejecimiento, los roedores presentan un empeoramiento en la realización de diferentes test de memoria, incluyendo la prueba de evitación pasiva de un único ensayo (Bartus y cols, 1980; Zornetzer y cols, 1982). Este deterioro parece ser debido principalmente a deficiencias en el proceso de consolidación (Bartus y cols, 1983), hecho que determinó la selección de un protocolo de inyección que afectara específicamente este proceso.

En nuestro modelo experimental, la inyección de tacrina a dosis crecientes (0,1-2,5 mg/kg) inmediatamente después de la fase de entrenamiento mejoró la retención de un hábito aversivo previamente aprendido en las ratas adultas, atenuando así los déficits de memoria reciente relacionados con la edad. Este efecto aumenta en función de la dosis, si bien no es posible establecer una clara relación dosis-respuesta, debido a las características inherentes al propio modelo experimental (Bartus y Dean, 1985). En términos de magnitud, la latencia

de evitación alcanzada por los animales de 18 meses después de la inyección de tacrina es similar a los valores de latencias de evitación alcanzados en animales jóvenes control, inyectados con salino. Por otra parte, la mejoría observada refleja una acción sobre la retención, dado que el protocolo de inyección utilizado, inmediatamente después de la fase de entrenamiento, afecta directamente a los procesos que operan después del entrenamiento, es decir no altera la adquisición, ni, en principio, las funciones sensoriales o motoras cuya integridad es necesaria para la realización de la prueba (Flood y Cherkin, 1988). No parece probable que la elevación de la latencia de evitación sea explicable en términos diferentes de la acción específica sobre memoria reciente, consecuencia del propio procedimiento de inyección o de otros efectos de la tacrina, dado que la acción de la misma se manifiesta únicamente en aquellos animales que recibieron descarga eléctrica, y en los que, por tanto, se estableció el proceso de retención. Los animales tratados con tacrina que no habían sido sometidos a un shock eléctrico, no manifestaron un aumento de la latencia lo que permite descartar una posible alteración sensorial o motora producida por el fármaco que pudiera modificar la respuesta al test.

Inmediatamente después del test de retención se realizaron las determinaciones neuroquímicas en corteza cerebral e hipocampo. La determinación bioquímica se realizó en todos los grupos experimentales: animales control, animales que habían recibido shock (0.5 mA, 3 s) y animales a los que se administró tacrina ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) por vía intraperitoneal inmediatamente después de la sesión de entrenamiento.

La determinación de los niveles de AMP cíclico en animales jóvenes y adultos, reveló que los niveles basales del segundo mensajero no sufren alteración alguna durante el envejecimiento ni en corteza cerebral ni en hipocampo, si bien en esta última estructura se detecta una tendencia a la disminución. Estos resultados concuerdan con otros aparecidos en la literatura (Scarpace y cols, 1991) que demuestran que la formación basal de AMP cíclico no se altera con la edad. Sin embargo, no existe acuerdo unánime en definir cuál es el estado de actividad del enzima en edades avanzadas. En estudios realizados en cerebro humano, los resultados son contradictorios; algunos autores (Ohms y cols, 1989) observaron, que en homogeneizados de hipocampo se producía una disminución de la formación basal de AMP

cíclico, sugiriendo una alteración de la actividad adenilato ciclase con la edad. Estos resultados son opuestos a los obtenidos en otro estudio (Danielsson y cols, 1988) en el que los niveles basales de AMP cíclico se encuentran incrementados con la edad y en pacientes diagnosticados de enfermedad de Alzheimer. En tejidos periféricos los resultados obtenidos son asimismo contradictorios, de forma que se han descrito aumentos significativos de la actividad basal del enzima en el riñón en el animal envejecido (Vanscheeuwijk y cols, 1990), que no se detectan a otros niveles, como el pulmón (Vanscheeuwijk y cols, 1989), el tejido adiposo (Scarpace y cols, 1988) o en linfocitos humanos (Krall y cols, 1983). Estos resultados sugieren que el comportamiento de la actividad basal del enzima con la edad no presenta un patrón homogéneo, sino que depende de la estructura anatómica estudiada, observándose además probablemente diferencias dependientes de la especie.

En condiciones de inhibición de la fosfodiesterasa mediante la adición al medio de IBMX, se observó un aumento significativo en la acumulación de AMP cíclico respecto a los niveles basales en corteza cerebral y de forma más importante en el hipocampo de ratas jóvenes. Por el contrario, al analizar los cambios producidos por la inhibición de la fosfodiesterasa en el hipocampo de animales adultos, no se observaron incrementos significativos de la formación de AMP cíclico con respecto a los niveles basales del segundo mensajero. Estos resultados sugieren que los procesos de degradación del AMP cíclico podrían estar alterados en algunas regiones cerebrales durante el envejecimiento. Las consecuencias funcionales de tal alteración se traducirían en un deterioro de la sensibilidad del sistema de transducción, puesto que un sistema enzimático de degradación intacto es imprescindible para la generación de picos breves del segundo mensajero, que constituyen la señal celular significativa. La falta de degradación rápida del AMP cíclico conduciría a un estado de estimulación sostenida que impediría a la célula una recuperación rápida de su capacidad de respuesta (Morgan, 1989). Por otra parte, en estudios previos (Schmidt y Thornberry, 1978; Krall y cols, 1983; Scarpace y cols, 1988; Vanscheeuwijk y cols, 1989) se ha descrito una tendencia a la disminución de la síntesis de AMP cíclico con la edad. En conjunto los resultados obtenidos sugieren una alteración de todo el proceso metabólico de formación y degradación del segundo mensajero con el envejecimiento.

Por último, tras la estimulación de la adenilato ciclase a nivel de receptor mediante la adición al medio de incubación de concentraciones submaximales de isoprenalina se obtiene un aumento significativo de la acumulación de AMP cíclico en todos los grupos experimentales. Tanto en los animales jóvenes como en el grupo de 18 meses el hipocampo resultó ser mucho más sensible a la estimulación con isoprenalina. Este dato no resulta sorprendente puesto que el hipocampo es una de las regiones cerebrales con una mayor densidad de adrenoceptores  $\beta$  (Reznikoff y cols, 1986; Lemmer y cols, 1993). Por otra parte, dado que se trata de una estructura cerebral directamente implicada en el procesamiento y almacenamiento de la información, nuestros resultados reforzarían la hipótesis de que el sistema  $\beta$ -adrenérgico juega un papel importante, pero complejo tanto en el aprendizaje como en la memoria.

La participación del sistema noradrenérgico se ha barajado también como elemento fundamental en los déficits cognoscitivos asociados con la edad. Esta asunción se basa en el reconocimiento de la existencia de marcadas alteraciones del sistema  $\beta$ -adrenérgico con la edad y en procesos patológicos relacionados como la enfermedad de Alzheimer, que podrían alterar los procesos de consolidación de la memoria. Las alteraciones observadas se refieren tanto a su número como a su modulación (Scarpace y Abrass, 1988, Weiss, 1988; Scarpace y cols, 1991). En nuestros experimentos se observa una tendencia a una mayor producción de AMP cíclico tras la estimulación con isoprenalina con la edad tanto a nivel hipocámpico como a nivel cortical, si bien únicamente es significativa en corteza cerebral. Estos resultados están en concordancia con la supersensibilidad de la adenilato ciclase a las catecolaminas con la edad descrita en trabajos previos (Greenberg, 1986, Scarpace y Abrass, 1988).

Nuestro diseño experimental no nos permite discriminar cuál de los subtipos del adrenoceptor  $\beta$  es responsable de la supersensibilidad observada, dado que utilizamos un agonista que no es capaz de diferenciarlos, como es la isoprenalina. Sin embargo, si consideramos que se ha descrito un incremento en la densidad de adrenoceptores del subtipo  $\beta_2$  pero no  $\beta_1$ , durante el envejecimiento y en la enfermedad de Alzheimer en el hipocampo (Kalaria y cols, 1989) probablemente debido a una disminución de la señal noradrenérgica procedente del locus coeruleus secundaria a la pérdida en el mismo de cuerpos celulares noradrenérgicos, la supersensibilidad de respuesta del sistema de transducción que se observa en los animales de

18 meses podría depender del aumento en los adrenoceptores  $\beta_2$ . En corteza cerebral la situación sería inversa, ya que se ha descrito un incremento del número de receptores  $\beta_1$  y no de adrenoceptores  $\beta_2$ . En esta región anatómica, por lo tanto, podría considerarse que este incremento en el número de adrenoceptores  $\beta_1$  sería responsable de la supersensibilidad en la respuesta de la adenilato ciclase.

Tal situación no ha sido descrita para otros tejidos, en los que a pesar de existir una clara alteración a diversos niveles de la cadena de transducción, la respuesta al agonista resulta inalterada (Vanscheeuwijck y cols, 1990). Los autores explican esta aparente contradicción en base al desarrollo a nivel celular de posibles mecanismos homeostáticos de compensación cuya naturaleza no ha podido ser determinada, que permitirían que la señal de salida del sistema permaneciera inalterada.

Una vez analizadas las modificaciones de la acumulación de AMP cíclico dependientes de la edad, nos planteamos estudiar el efecto de la tacrina sobre las mismas. Para ello estudiamos las modificaciones neuroquímicas producidas por el fármaco en los animales sometidos al test de evitación pasiva. Un hallazgo no esperado en nuestros experimentos lo constituye el hecho de que la exposición a un único shock en las patas de baja intensidad (0.5 mA) modifique significativamente los niveles de AMP cíclico acoplados a la estimulación del adrenoceptor  $\beta$ . Este efecto tiene lugar tanto en animales jóvenes como en el grupo de edad avanzada, y no se observa ni en condiciones basales ni tras la inhibición de la fosfodiesterasa. Ello sugiere que se trate de un efecto relacionado específicamente con la activación del adrenoceptor  $\beta$ , sin que en principio sea atribuible a la actividad del propio sistema enzimático.

Por el momento, únicamente se han caracterizado las consecuencias de la administración de electroshock, como terapia en los cuadros de depresión, sobre la actividad adenilato ciclase. Sin embargo, no se conoce bien la influencia de un shock agudo en las patas sobre la formación de AMP cíclico. No obstante, se ha demostrado que la exposición a un shock en las patas de intensidad media modifica la síntesis de noradrenalina en sinaptoneurosomos hipocámpicos dando lugar a un pico breve de noradrenalina en esta estructura (Graham-Jones

y cols, 1983). Esta síntesis aumentada se hace más sostenida cuando el tratamiento se administra crónicamente expresando probablemente una modificación plástica en el hipocampo.

A la vista de estos datos, si los resultados obtenidos en nuestros experimentos dependieran únicamente de la propia exposición a la descarga eléctrica, sería de esperar un aumento, y no una disminución en la respuesta de la adenilato ciclase a la estimulación del adrenoceptor  $\beta$ . Además el efecto se produciría también en situaciones en las que no se introduce exógenamente el agonista, ya que aumentaría la disponibilidad de noradrenalina endógena en el hipocampo. Por último, el pico de noradrenalina solo se observa durante un espacio de tiempo corto (Graham-Jones y cols, 1983), y sin embargo, las modificaciones que observamos en la acumulación de AMP cíclico se mantienen al menos durante 24 horas, momento en el que se realiza la determinación neuroquímica. Ello nos lleva a sugerir una interpretación diferente, de forma que las modificaciones observadas podrían depender de la propia experiencia y no de la exposición a la descarga eléctrica.

A favor de esta hipótesis existen datos en la literatura que sugieren que la actividad adenilato ciclase es un elemento crítico en la memoria a corto plazo, de tal forma que la formación y consolidación de la misma parece ser el resultado de la convergencia de estímulos sobre la adenilato ciclase, induciendo la fosforilación AMP cíclico-dependiente de diversas proteínas (Morgan, 1990). Todo ello hace plausible que la participación del sistema noradrenérgico sea mediada por elementos de transducción acoplados al adrenoceptor  $\beta$ , como proteínas G, niveles intracelulares de calcio o actividad adenilato ciclase, que podrían ser objeto directo de los cambios plásticos en la transmisión noradrenérgica y de sus consecuencias funcionales.

Finalmente se analizó la acción de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico. La administración de tacrina ( $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p.) inmediatamente después de la fase de entrenamiento produce una disminución en la acumulación de AMP cíclico en condiciones basales en todos los grupos experimentales. Esta disminución no alcanza significación estadística en el hipocampo de los animales envejecidos pero sí en los demás grupos. En principio, la reducción de actividad basal del sistema adenilato ciclase es difícilmente

observable en tejido cerebral mediante tratamientos farmacológicos dado que el flujo a través de la vía del AMP cíclico es muy reducido en condiciones de reposo, lo que hace difícil la apreciación de una reducción adicional en sus niveles (Barnes, 1991). La significación biológica de tal efecto resulta difícil de evaluar, dado que no es bien conocido el papel a nivel celular de este tono basal del segundo mensajero.

Con el fin de descartar que la acción de la tacrina sobre la acumulación basal de AMP cíclico pudiera deberse a un incremento en el proceso de degradación del segundo mensajero, los experimentos se repitieron en presencia de IBMX. En estas condiciones la tacrina únicamente produjo disminuciones estadísticamente significativas de la acumulación de AMP cíclico en animales jóvenes, pero no en las ratas de 18 meses. Estos resultados sugieren que la acción de la tacrina en los animales jóvenes no dependería de un incremento en la degradación de AMP cíclico ya que se mantiene una vez que el enzima responsable de la metabolización del segundo mensajero ha sido bloqueado. Sin embargo, en los animales envejecidos, en los que se han observado alteraciones en los procesos de degradación del AMP cíclico, la tacrina no es capaz de reducir los niveles de AMP cíclico cuando se inhibe la fosfodiesterasa mediante una xantina, como es el IBMX. Ello sugiere que en condiciones en que los procesos metabólicos ligados a la degradación del AMP cíclico se encuentran alterados, como sucede en el envejecimiento (Schmidt y Thornberry, 1978) el fármaco podría actuar sobre tales procesos.

En general, parece que los agonistas no regulan la concentración de AMP cíclico por afectar directamente la actividad de la fosfodiesterasa, por lo que el principal determinante de la concentración de AMP cíclico en la célula es la actividad adenilato ciclase. En este contexto es interesante recordar que se han descrito algunos agentes farmacológicos que inhiben la actividad fosfodiesterásica, pero tales compuestos únicamente producen efectos significativos en condiciones en las que existe una activación simultánea de la adenilato ciclase. En nuestro caso, parece que la tacrina ejercería su efecto en el animal envejecido por activar la fosfodiesterasa, operando por lo tanto para reducir los niveles del nucleótido cíclico. Tal acción podría favorecer mecanismos fisiológicos que operan a nivel celular, en condiciones en las que tales mecanismos se encuentran alterados, al contrario de lo que sucede con los

fármacos inhibidores de la fosfodiesterasa, ya que no se han descrito por el momento mecanismos celulares por los que se inhibía la actividad fosfodiesterásica.

Finalmente, en condiciones de estimulación del adrenoceptor  $\beta$  mediante incubación con isoprenalina, el tratamiento *in vivo* con tacrina indujo una reducción estadísticamente significativa de la formación de AMP cíclico en ambos grupos de edad. Al analizar las diferentes estructuras cerebrales, el hipocampo resultó ser mucho más sensible a la acción de la tacrina.

El efecto de la tacrina fue analizado en animales que habían sido sometidos al test de evitación pasiva, y por tanto podría arguirse que se tratara de una sumación de efectos con los producidos por la descarga eléctrica. Sin embargo, el efecto de la tacrina fue similar, en términos cuantitativos al obtenido en una serie experimental en la que se estudian los efectos de la inyección aguda del fármaco sacrificando a los animales a los 30 minutos de la administración y que será analizada a continuación. Por lo tanto, no parece probable que el efecto de la tacrina observado en los animales sometidos a descarga eléctrica sea consecuencia de una sumación de efectos con tal descarga.

Estos resultados sugieren que los efectos de la tacrina podrían depender parcialmente de una acción sobre la actividad del complejo adenilato ciclasa acoplado al adrenoceptor  $\beta$ , actuando sobre alguno de los elementos que lo componen. Nuestro diseño experimental no nos permite descartar que la tacrina pudiera ejercer una acción directa sobre el adrenoceptor  $\beta$ . Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la tacrina presenta escasa afinidad por este adrenoceptor (Drukarch y cols, 1988), lo que descartaría en principio, una acción directa a este nivel. Como se describió exhaustivamente en la Introducción de esta Tesis, han sido descritas modificaciones en la densidad de los adrenoceptores  $\beta$ , que se encuentra significativamente reducido en determinadas regiones cerebrales en el animal anciano (Scarpace y Abrass, 1988), al igual que la velocidad de síntesis *de novo* de estos receptores, que se encuentra asimismo afectada como consecuencia del proceso de envejecimiento (Greenberg, 1986). Estas alteraciones tienen como consecuencia clave una alteración en la sensibilidad de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, que está aumentada en edades avanzadas. Por

lo tanto, parece probable que la mejora de la función cognoscitiva en los animales ancianos obtenida con la tacrina, podría depender, al menos parcialmente, de una normalización de la funcionalidad del sistema de neurotransmisión  $\beta$  adrenérgico en el hipocampo, merced a la disminución de la respuesta a catecolaminas inducida por la tacrina. Estos resultados apoyarían la existencia de una alteración en la sensibilidad del adrenoceptor  $\beta$  tanto a nivel hipocámpico como a nivel cortical durante el envejecimiento, que podría ser normalizada por la acción de la tacrina sobre el sistema de transducción acoplado a este adrenoceptor.

Se ha de tener en cuenta al analizar la relevancia funcional en procesos cognoscitivos de la acción de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico, el hecho de que las determinaciones neuroquímicas se realizaron 24 horas después de la administración del fármaco, momento en el cual los niveles cerebrales de tacrina son muy bajos, dado que la concentración del fármaco en cerebro de rata disminuye con una semivida biológica de 1,4 horas (Nielsen y cols, 1989). Ello pudiera hacer pensar que las acciones observadas no dependen de un efecto directo del fármaco.

En efecto, nuestro modelo experimental no permite descartar que la acción de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico acoplada a la activación del adrenoceptor  $\beta$  no sea un efecto específicamente relacionado con el propio cambio plástico producido por la experiencia. El hecho de utilizar un protocolo de inyección en que el fármaco se administra inmediatamente después del entrenamiento, momento en el que se establece el proceso de consolidación, y en el que en principio sería esperable que se produjeran cambios neuroquímicos dependientes de la propia experiencia, podrían hacer pensar que tales efectos no dependen de la acción del fármaco sino que son inducidos por la propia experiencia novedosa, tratándose por lo tanto de fenómenos específicos de los procesos de almacenamiento de información nueva, pero no dependientes del fármaco. A favor de esta hipótesis se encuentra el hecho de que las modificaciones neuroquímicas inducidas por la exposición de los animales al propio test de evitación dan lugar a perturbaciones de la actividad  $\beta$ -adrenérgica en el mismo sentido. Más aún, en estudios realizados en nuestro Departamento (Escorihuela y cols, 1993) se ha demostrado que la exposición postnatal a un modelo de enriquecimiento ambiental, manipulación que reduce el deterioro cognoscitivo

asociado a la edad, da lugar a modificaciones neuroquímicas en el sistema efector celular del adrenoceptor  $\beta$  en el mismo sentido a las inducidas por la tacrina.

Con el fin de determinar si la acción farmacológica propia de la tacrina se caracterizaba asimismo por un efecto similar sobre la acumulación de AMP cíclico, se han realizado experimentos en los que se analizaron las acciones sobre la acumulación basal y la formación de AMP cíclico ligada a la activación del adrenoceptor  $\beta$ , en un grupo de animales no sometidos a un test de evitación pasiva a los que se administró tacrina por vía intraperitoneal a la misma dosis que en la serie experimental precedente. Los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la inyección, ya que se ha descrito que el fármaco se mantiene a concentraciones superiores a  $1 \mu\text{M}$  en cerebro de rata durante la primera hora (Nielsen y cols, 1989).

En estas condiciones experimentales los niveles de AMP cíclico en situación control resultaron ser similares en ambas series experimentales, que son por lo tanto comparables. La tacrina 30 minutos después de su inyección, sin someter al animal a un test de retención, reduce la acumulación de AMP cíclico acoplada al adrenoceptor  $\beta$ , lo que sugiere que los efectos observados dependan efectivamente de la acción de la tacrina. Resulta, sin embargo llamativo el hecho de que el efecto se mantenga 24 horas más tarde. Esto, unido a que la estructura donde se observan cambios más significativos es el hipocampo, podría hacer pensar que la tacrina esté ejerciendo un efecto farmacológico en el mismo sentido que el efecto neuroquímico que se produciría a nivel hipocámpico como consecuencia de la propia experiencia. Por último cabe señalar que en un análisis superficial la acción de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico acoplada a la activación del adrenoceptor  $\beta$  podría parecer opuesta a la asunción generalizada de que la mejora de la neurotransmisión favorece los procesos de retención y por tanto maniobras en sentido contrario resultarían en un deterioro de la consolidación. En este sentido, recientemente se ha demostrado que la tacrina modifica la actividad de la enzima monoaminoxidasa (MAO) a nivel central, sugiriendo la posible participación del sistema catecolaminérgico en su mecanismo de acción (Adem y cols, 1989).

Por otra parte, la manipulación farmacológica de la actividad del adrenoceptor  $\alpha_2$  da lugar a una sensible mejoría de la función cognoscitiva (Arnsten y Leslie, 1991). En este sentido, si bien los autores asumen tal efecto como fundamentalmente postsináptico, no se ha podido descartar completamente una acción sobre un sitio presináptico, lo cual iría en línea con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En la primera parte de esta Tesis se ha demostrado la capacidad de la tacrina para reducir los déficits cognoscitivos observables en animales de 18 meses. Este efecto sobre procesos cognoscitivos se correlaciona a nivel bioquímico con una alteración en el sistema de transducción de señal acoplado al adrenoceptor  $\beta$  en corteza cerebral e hipocampo por una acción de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico de ratas jóvenes y envejecidas. Tal efecto se obtuvo en condiciones basales y tras la estimulación de la formación de AMP cíclico ligada a la activación del adrenoceptor  $\beta$  mediante isoprenalina. Estos resultados sugerían que la tacrina, además de sus propiedades como anticolinesterásico, a las que clásicamente se había adscrito su capacidad de mejorar la retención, era capaz de modificar concomitantemente la funcionalidad del sistema noradrenérgico en el sistema nervioso central.

Puesto que las tendencias más actuales consideran que el deterioro de memoria reciente asociado al envejecimiento depende de la alteración conjunta de diversos sistemas de neurotransmisión (Weiss, 1988; Boller y Forette, 1989; Scarpace y cols, 1991), la utilización de agentes capaces de afectar simultáneamente la funcionalidad de diferentes sistemas de neurotransmisión resultaría una terapéutica más eficaz. En concreto, la alteración de la funcionalidad del adrenoceptor  $\beta$  puede afectar los procesos de memoria fundamentalmente a corto plazo de forma que un fármaco capaz de modificar concomitantemente la funcionalidad del sistema  $\beta$  adrenérgico y colinérgico a nivel central constituiría un instrumento farmacológico de excepción para abordar el tratamiento de las deficiencias cognoscitivas del anciano.

El hecho de que la tacrina modifique la funcionalidad del adrenoceptor  $\beta$  a nivel hipocámpico la convierte en un instrumento farmacológico de excepción en el restablecimiento de la

función cognoscitiva. Sin embargo, una de las mayores limitaciones que presenta el tratamiento con tacrina lo constituye su toxicidad a nivel hepático (Summers y cols, 1986). Por lo tanto, maniobras farmacológicas que permitieran reducir la dosis de tacrina sin mermar su eficacia clínica resultarían de enorme interés al ampliar su margen terapéutico. Por todo ello la última fase de los estudios *in vivo*, se ha dirigido a intentar diseñar estrategias terapéuticas que permitan alcanzar este objetivo. El ánimo de estos experimentos era buscar un agente farmacológico que consiguiera aumentar la potencia de la tacrina para restablecer las funciones cognoscitivas en el animal envejecido. Por ello nos planteamos analizar la acción de la tacrina en presencia de un agente bloqueante del adrenoceptor  $\beta$ . Escogimos el propranolol, por su conocida capacidad antagonista adrenérgica y porque en estudios muy iniciales se había podido demostrar que dosis bajas de este fármaco mejoraban la retención en el test de evitación pasiva. Nosotros no pudimos replicar tal resultado, y de hecho el propranolol no modificó *per se* la latencia de evitación en los animales de 18 meses. Cuando los animales recibieron conjuntamente propranolol y tacrina después del entrenamiento, el efecto de la tacrina se vió ligeramente potenciado, pero tal potenciación no llegó a alcanzar la significación estadística. Sin embargo, el rango intercuartílico sí se redujo notablemente, expresando que el efecto en este caso fue mucho más homogéneo en todos los animales. El hecho de que la potenciación alcanzada no fuera más importante podría ser quizás atribuible a que hemos utilizado un antagonista no selectivo y que por lo tanto no diferencia entre los dos subtipos de adrenoceptores  $\beta$ . Dado que ambos subtipos sufren modificaciones en su número de signo contrario con el envejecimiento, y que tales alteraciones quedan enmascaradas cuando se analizan las modificaciones sin diferenciarlos, parece posible que esta diferencia pueda tener una consecuencia funcional. En nuestra opinión, probablemente la utilización de antagonistas selectivos constituiría un elemento farmacológico más exacto para conseguir una potenciación.

En resumen, la primera parte de esta Tesis sugiere que la capacidad de la tacrina para reducir los déficits cognoscitivos observables en animales de 18 meses se correlaciona a nivel bioquímico con una alteración en el sistema de transducción de señal acoplado al adrenoceptor  $\beta$  en corteza cerebral e hipocampo de rata. Esta acción neuroquímica parece ser específica de la tacrina, aunque podría tratarse de un efecto potenciador de un cambio

plástico endógeno ya existente como consecuencia de la experiencia en sí. Los resultados expuestos sugieren que la eficacia terapéutica de la tacrina, probablemente no se deba únicamente a sus propiedades anticolinesterásicas, sino que pueda depender de acciones neuroquímicas diversas a nivel central, entre las que podría encontrarse un efecto sobre el sistema de transducción acoplado al adrenoceptor  $\beta$ . Por otro lado nuestros resultados apoyan la participación del adrenoceptor  $\beta$  en los procesos de memoria reciente y sugieren que el sistema adenilato ciclase acoplado a este receptor pudiera ser un eslabón primario en la cadena de eventos neuroquímicos que se activan en el hipocampo tras la experiencia novedosa. Estos resultados podrían contribuir a la caracterización de las bases neuroquímicas de los procesos de memoria reciente y de sus alteraciones responsables de los déficits cognoscitivos observados en el anciano.

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

Los efectos del tratamiento *in vivo* con tacrina sobre la formación de AMP cíclico acoplada a la estimulación del sistema  $\beta$ -adrenérgico, sugieren que la eficacia terapéutica de este fármaco probablemente no se deba únicamente a sus propiedades anticolinesterásicas, sino que pueda depender de acciones neuroquímicas diversas a nivel central, entre las que podría encontrarse un efecto sobre el sistema de transducción acoplado al adrenoceptor  $\beta$ . Por ello, la segunda fase del estudio se ha dirigido a la caracterización farmacológica de los efectos de la tacrina y a profundizar en el mecanismo a través del cual es capaz de alterar la funcionalidad de adrenoceptor  $\beta$ . Para ello se determinaron las modificaciones provocadas por el fármaco *in vitro*, sobre la formación de AMP cíclico acoplada al adrenoceptor  $\beta$  en corteza cerebral e hipocampo de ratas jóvenes, en diferentes condiciones experimentales. Así, se analiza la acción de la tacrina sobre el adrenoceptor  $\beta$  a diferentes niveles del complejo adenilato ciclase. A continuación, y dado que clásicamente se ha asociado la eficacia de la tacrina con sus propiedades inhibidoras de la acetilcolinesterasa, se estudia la posible existencia de un componente colinérgico en la acción de la tacrina. Para alcanzar este último objetivo se evaluó si la acción de este derivado de la 4-aminopiridina sobre el mecanismo de transducción acoplado al sistema  $\beta$ -adrenérgico, es compartida por la fisostigmina y la posible

influencia del bloqueo de receptores muscarínicos mediante la adición al medio de incubación de atropina, sobre la acción de la tacrina. Por último, y pese a que se ha descrito que la tacrina no muestra afinidad por los receptores adrenérgicos (Drukarch y cols, 1988), se investigó si sus efectos sobre la adenilato ciclase eran debidos a una actuación de la tacrina directamente sobre el receptor  $\beta$ -adrenérgico. Con esta finalidad se realizaron una serie de experimentos en una preparación farmacológica clásica, como es el baño de órgano aislado que nos permite estudiar el sistema  $\beta$ -adrenérgico, sin influencias reguladoras de tipo nervioso o humorar.

A continuación, se analizó si los efectos observados para la tacrina eran extensibles a otros componentes del sistema noradrenérgico o bien se circunscribían a nivel del acoplamiento del adrenoceptor  $\beta$  con la adenilato ciclase. En concreto se estudiaron las modificaciones de los niveles de segundos mensajeros asociados a la activación del adrenoceptor  $\alpha_1$  (tanto AMP cíclico como formación de fosfatos de inositol).

### 1. EFFECTOS DE LA TACRINA SOBRE EL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO

En nuestro diseño experimental la incubación durante 10 minutos con tacrina ( $1 \mu\text{M}$ ) no modificó significativamente los niveles basales de AMP cíclico, con respecto a los valores control en corteza cerebral ni en hipocampo. Asimismo, no se produjeron modificaciones en los niveles del segundo mensajero tras la inhibición de la degradación de AMP cíclico mediante IBMX ( $1 \text{ mM}$ ) en estructuras corticales o hipocámpicas. En ambas situaciones experimentales, sin embargo se observa una clara tendencia a la disminución.

En estos ensayos los niveles del segundo mensajero fueron comparables a los obtenidos en la serie de experimentos realizados *in vivo*, por lo que podemos decir que en los experimentos *in vitro* la tacrina ve reducida su capacidad de afectar la acumulación de AMP cíclico. Este hecho resulta llamativo puesto que si se tratase de un efecto farmacológico propio de la tacrina, sería esperable que se produjera de forma más importante en un modelo aislado, y libre por tanto de interferencias propias de los modelos *in vivo*. Parece pues que

se produzca un efecto potenciador cuando el animal es sometido al test de evitación pasiva, y por lo tanto en él se ha establecido el proceso de retención. Esto apoyaría una vez más la posibilidad de que tales modificaciones dependan de cambios plásticos producidos en el hipocampo como consecuencia de la propia experiencia.

En los experimentos *in vitro*, la acción más importante de la tacrina se desarrolló en condiciones de estimulación de la actividad adenilato ciclase con isoprenalina. En estos experimentos, la incubación durante 10 minutos con tacrina dio lugar a un marcado y significativo decremento de la síntesis de AMP cíclico secundaria a la activación del adrenoceptor  $\beta$  en todos los grupos de edad. Esta reducción alcanzó significación estadística tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral respecto a la situación control. En términos de magnitud, el efecto de la tacrina es más importante a nivel hipocámpico, al igual que sucedía en los estudios *in vivo*. A la vista de estos resultados, se podría arguir que los efectos de la tacrina podrían depender, al menos parcialmente de una acción directa sobre la actividad del complejo adenilato ciclase acoplado al adrenoceptor  $\beta$ . Sin embargo, en nuestros experimentos, la preincubación con tacrina 1  $\mu\text{M}$  dió lugar a una pérdida progresiva de la capacidad de la isoprenalina para estimular la formación de AMP cíclico originando un desplazamiento no paralelo hacia la derecha de la curva concentración-respuesta para la isoprenalina y una pérdida de efecto máximo del 30% en corteza cerebral y del 40% en el hipocampo. Se ha de considerar, asimismo, que recientemente se ha evidenciado que la tacrina no presenta afinidad por los adrenoceptores  $\beta$  en concentraciones en el rango micromolar. En conjunción con estos datos, los resultados expuestos parecen indicar que la acción de la tacrina sobre el sistema  $\beta$  adrenérgico no depende de una acción directa sobre el receptor.

Nuestro modelo experimental no nos permite descartar que la tacrina esté ejerciendo sus efectos sobre la acumulación de AMP cíclico de forma indirecta a través de una modificación del equilibrio iónico intracelular. En este sentido se ha descrito una acción de la tacrina sobre la conductancia para el potasio de forma que su efecto se caracterizaría por una reducción de las corrientes de potasio (Freeman y Dawson, 1991). La conductancia más sensible a la acción de la tacrina sería aquella generada por el neurotransmisor, la cual es activada a través

de una proteína G que sirve de nexo entre el receptor ocupado y el canal de potasio (Halliwell y Grove, 1989). Tal reducción no parece estar específicamente asociada a ningún receptor en concreto, y se produce a concentraciones en el rango micromolar, si bien es relevante a partir de concentraciones de 10  $\mu\text{M}$ . Puesto que en nuestros experimentos la concentración empleada es 1  $\mu\text{M}$ , no parece probable que el efecto de la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico dependa de su acción sobre corrientes de potasio. Más aún, el efecto final esperable de un bloqueo en la salida de potasio favorecida por neurotransmisores en todo caso sería de carácter excitador, lo que en principio habría de favorecer un aumento en la producción del segundo mensajero. En nuestros experimentos, por contra, observamos un efecto depresor de la producción de AMP cíclico.

Un aspecto interesante a considerar cuando se evalúa la posible significación terapéutica del efecto de la tacrina sobre la actividad adenilato ciclase acoplada al adrenoceptor  $\beta$ , es la constante de inhibición que presenta, que se encuentra en el rango de concentraciones terapéuticas descrita para la tacrina (Freeman y cols, 1991). No se debe olvidar que muchas de las acciones descritas para la tacrina en diferentes modelos experimentales tienen lugar a concentraciones muy por encima de su rango de concentraciones terapéuticas. Este hecho hace que muchas de ellas puedan ser probablemente marginales y que no pueda adscribirse a ellas su eficacia terapéutica.

De la primera serie de experimentos presentada se podía deducir que la tacrina no ejercería sus efectos por una interacción directa sobre el adrenoceptor  $\beta$ . Sin embargo, el sistema de transducción acoplado a este receptor se compone de varias unidades (Neer y Clapham, 1988), y por lo tanto la acción de la tacrina podía desarrollarse a cualquier nivel de la cadena de transducción. Así pues, en una segunda serie experimental *in vitro* analizamos a qué nivel se producía el efecto de la tacrina. Con el fin de determinar si los efectos observados se debían a una acción del derivado de la 4-aminopiridina sobre la subunidad catalítica de la adenilato ciclase, se estudió la influencia de la estimulación de la actividad adenilato ciclase mediante forskolina sobre el efecto de la tacrina. La forskolina es un diterpeno que activa la adenilato ciclase por una interacción directa con la subunidad catalítica del enzima (Laurenza y cols, 1989). En nuestro modelo experimental, la forskolina, por sí misma indujo

un incremento muy marcado y significativo concentración-dependiente en la formación de AMP cíclico, acorde con los datos señalados en la literatura. Cuando se analizó la influencia de la tacrina ( $1 \mu\text{M}$ ) sobre este efecto, no se encontraron diferencias significativas en la acción de la forskolina. Así pues, la reducción de la producción de AMP cíclico producida por la tacrina no parece poderse atribuir a su posible interacción con la subunidad catalítica de la adenilato ciclase, al menos en las condiciones experimentales utilizadas.

El hecho de que pudiera descartarse una acción directa de la tacrina tanto sobre el adrenoceptor  $\beta$  como sobre la subunidad catalítica del complejo adenilato ciclase, determinó que los siguientes experimentos intentaran establecer si la acción de la tacrina podía ser indirecta a través de su acción facilitadora de la neurotransmisión colinérgica. Este tipo de abordaje tenía un interés doble: por una parte permitiría profundizar en el mecanismo de acción de la tacrina, y por otra contribuiría a la caracterización de la vinculación entre los sistemas noradrenérgico y colinérgico en el hipocampo. En este sentido, es interesante recordar que se ha sugerido la existencia de una interrelación entre ambos sistemas de neurotransmisión a nivel central, la cual podría estar directamente involucrada en los procesos de memoria y aprendizaje y en procesos de plasticidad neuronal. Así, ha podido ser demostrado en animales jóvenes y en adultos, que la modulación farmacológica de los niveles de catecolaminas cerebrales afecta tanto a los procesos de aprendizaje como a la retención, siendo este efecto diferente en animales en los que se conserva intacta la función cognoscitiva y en aquellos en los que existe una disfunción del sistema colinérgico (Flood y cols, 1980; Zornetzer, 1985; Arnsten y Goldman-Rakic, 1987). Es más, parece probable que las deficiencias en el sistema noradrenérgico que se observan durante el envejecimiento puedan influenciar la respuesta del sistema nervioso central a fármacos de carácter colinomimético, alterando su efectividad. Resulta pues interesante analizar la posible relación entre las acciones de la tacrina sobre el sistema colinérgico y las descritas sobre el sistema  $\beta$  adrenérgico. La tacrina gracias a su capacidad de afectar la funcionalidad de ambos sistemas neuroquímicos, podría resultar un potente instrumento farmacológico en el restablecimiento de la función cognoscitiva.

Con el fin de establecer si el efecto de la tacrina observado en nuestros experimentos podía ser debido parcialmente a su acción de mejora de la transmisión colinérgica, la cual secundariamente afectaría la funcionalidad del sistema  $\beta$ -adrenérgico, el abordaje experimental inicial consistió en el bloqueo de los receptores muscarínicos mediante la preincubación con atropina. La atropina por sí misma no fue capaz de modificar la formación de AMP cíclico en ninguno de los grupos experimentales. Ello sugiere que el bloqueo de receptores muscarínicos *per se* no es capaz de modificar la relación entre el sistema  $\beta$  adrenérgico y colinérgico en condiciones control. De igual forma, el bloqueo de receptores muscarínicos tampoco modificó el efecto de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico en corteza cerebral. Sin embargo, la preincubación con atropina previno parcialmente el efecto inducido por la tacrina en el hipocampo, y este antagonismo alcanzó significación estadística en condiciones de estimulación con isoprenalina ( $10 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0.05$ ). Ello hace pensar que el incremento de la actividad colinérgica puede ser parcialmente responsable de la acción de la tacrina a nivel hipocámpico, reforzando la idea de la existencia de una posible relación entre los sistemas  $\beta$  adrenérgico y colinérgico en dicha estructura cerebral.

El hecho de que la atropina fuera capaz de prevenir parcialmente la acción de la tacrina y de que ésta resulte más eficaz que otros fármacos anticolinesterásicos, para inducir mejoras cognoscitivas, nos condujo a investigar si un agente anticolinesterásico, en principio más potente que la tacrina, como es la fisostigmina podía afectar la acumulación de AMP cíclico ligada a la activación del adrenoceptor  $\beta$ . Sin embargo, la fisostigmina no produjo *in vitro* ninguna modificación en la acumulación de AMP cíclico. El hecho de que el efecto de la tacrina sobre el sistema de transducción acoplado al adrenoceptor  $\beta$  no sea compartido por la fisostigmina, podría explicar las diferencias observadas en la eficacia clínica entre ambas sustancias.

Por otra parte, se analizó la posible sumación de efectos entre la tacrina y la fisostigmina estudiando la acción del derivado de la 4-aminopiridina en presencia de fisostigmina. En nuestro diseño, no fue posible demostrar tal sumación de efectos en miniprismas de corteza cerebral. Ello sugiere que, a pesar de que parece existir un componente colinérgico en la acción de la tacrina a nivel hipocámpico, su efecto sobre el sistema de señal acoplado al

adrenoceptor  $\beta$  no es reproducible mediante otro potente fármaco anticolinesterásico, como es la fisostigmina.

Clásicamente se ha asumido que el mecanismo primario de acción de la tacrina para mejorar la función cognoscitiva reside en su capacidad de inhibir la colinesterasa (Ho y Freeman, 1965; Nielsen y cols, 1989). Sin embargo, la tacrina muestra una mayor eficacia clínica para restablecer las deficiencias cognoscitivas que otros fármacos anticolinesterásicos mucho más potentes como, por ejemplo, la fisostigmina (Bartus y Dean, 1988). Estas discrepancias en los resultados clínicos han sido adscritas al hecho de que ambas sustancias poseen un diferente patrón farmacocinético o bien a que la inhibición de la colinesterasa pueda no ser suficiente para inducir estas mejoras. Más aún, los resultados respecto a su eficacia para inhibir la actividad acetilcolinesterásica tras su administración sistémica son contradictorios, sugiriendo que éste podría no ser su mecanismo de acción primario. Por otra parte, sus propiedades anticolinesterásicas se manifiestan a concentraciones muy superiores a su rango terapéutico. Todo ello hace pensar que la gran efectividad de la tacrina podría estar relacionada con una actividad a diversos niveles, que lograra la restauración de diferentes sistemas de neurotransmisión además del colinérgico (Drukarch y cols, 1988).

Así pues, nuestros experimentos sugieren que el sistema colinérgico podría ejercer un papel permisivo en la acción de la tacrina, de forma que su activación sería necesaria pero no suficiente para reproducir sus efectos sobre el sistema noradrenérgico. Por otra parte estos resultados apoyarían la existencia de una interacción entre el sistema colinérgico y noradrenérgico en el sistema nervioso central.

El conducto deferente de rata es una preparación de músculo liso densamente inervada por fibras nerviosas simpáticas, que ha sido utilizado como tejido de elección para estudiar diversos aspectos de la transmisión noradrenérgica (Sjöstrand, 1965).

Como es sabido, las contracciones del conducto deferente inducidas por estimulación de campo se deben, en principio, a la liberación de neurotransmisores, noradrenalina (McGrath, 1978) y ATP (Sneddon y cols, 1984; Hourani y cols, 1993), seguida por una interacción de

dichas sustancias con receptores situados en la musculatura lisa. La reducción de la amplitud de las contracciones mediada por adrenoceptores  $\beta$ , se supone que es debida a un bloqueo de alguna de las etapas de esta cadena de eventos. Basándonos en esta asunción se puede hipotetizar que los responsables de la relajación causada por los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos pueden ser dos tipos de receptores, uno de ellos presináptico, localizado en el terminal nervioso, siendo el otro un receptor postsináptico situado en la célula muscular. La interacción de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos con los receptores presinápticos provocaría una perturbación de la actividad nerviosa y en consecuencia daría lugar a una modificación de la liberación de neurotransmisor y, por tanto, de las contracciones, mientras que la estimulación de los adrenoceptores  $\beta$  postsinápticos podría antagonizar las contracciones inducidas por la interacción neurotransmisor-receptor en el músculo liso.

La estimulación con sales de bario del conducto deferente permite evidenciar que, pese a que los receptores presinápticos podrían ser alcanzados por los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, esta interacción sería inefectiva o silenciosa ya que las contracciones provocadas por bario son independientes de la liberación de neurotransmisor (Jurkiewicz y cols., 1971). Así pues, sólo la interacción con receptores postsinápticos podría explicar la acción de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Por otra parte, diferentes estudios, tanto funcionales en los que se han empleado agonistas selectivos y no selectivos de los diferentes subtipos de adrenoceptores  $\beta$  (Vohra, 1979; Lotti y cols., 1980; Díaz-Toledo y Jurkiewicz, 1990), como de fijación de radioligandos (May y cols., 1985), han demostrado que estos receptores postsinápticos pertenecen al subtipo  $\beta_2$ .

Es improbable que los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos participen en esta acción. Así lo evidencian estudios realizados por Díaz-Toledo y Jurkiewicz (1991), en los que tras la inactivación irreversible de estos receptores con dibenamina, la clonidina, un agonista presináptico clásico, no causaba ninguna relajación de las contracciones producidas en el conducto deferente por estímulo eléctrico.

En general, cuando los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos se añaden a una preparación de conducto

deferente no se observa relajación del órgano, salvo que éste sea sometido a tensión por acción de agonistas, de sales de bario o tras provocar contracciones secuenciales mediante un estímulo eléctrico. En nuestros experimentos, la isoprenalina, un agonista  $\beta$ -adrenérgico no selectivo, produjo una disminución concentración-dependiente de la amplitud de la contracción provocada por estímulo eléctrico, sin afectar a la línea de base, coincidiendo con los resultados obtenidos por Díaz-Toledo y Jurkiewicz (1990).

El tratamiento del conducto deferente con tacrina a concentraciones 1 y 10  $\mu\text{M}$ , durante 10 minutos provocó una disminución de la inhibición máxima producida por isoprenalina. Estos datos son consistentes con nuestros resultados bioquímicos en los que se observa que la tacrina disminuye la formación del segundo mensajero asociado a la estimulación del adrenoceptor  $\beta$ .

Por otra parte, se observa que no hay modificaciones significativas de la potencia de la isoprenalina para producir su respuesta. Todo esto nos indicaría que la tacrina se comporta como un inhibidor no competitivo del receptor  $\beta$ -adrenérgico, y por tanto, su acción se produce a un nivel que no se corresponde con el sitio de fijación de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Estos resultados refuerzan los estudios realizados mediante técnicas de fijación con radioligandos en los que se observa que la tacrina no posee afinidad hacia dicho receptor (Drukarch y cols, 1988; Nielsen y cols, 1989).

## 2. EFFECTOS DE LA TACRINA SOBRE EL SISTEMA $\alpha$ -ADRENÉRGICO

La estimulación del adrenoceptor  $\alpha_1$  se ha asociado clásicamente a la activación del metabolismo de fosfoinosítidos de membrana (Berridge, 1984). Sin embargo, existen evidencias de que la activación de estos receptores también aumenta la formación de AMP cíclico (Johnson y Minneman, 1987).

En vista de los efectos observados para la tacrina sobre la acumulación de AMP cíclico acoplada al adrenoceptor  $\beta$ , nos propusimos discernir si esta acción era específica para estos

receptores o bien se trataba de un efecto más inespecífico sobre la acumulación de AMP cíclico.

En nuestro modelo experimental observamos que la incubación durante 10 minutos de los miniprismas procedentes de corteza cerebral e hipocampo de animales jóvenes y en condiciones de inhibición de la adenilato ciclase, con concentraciones crecientes de noradrenalina producía un aumento de la acumulación de AMP cíclico. En este caso, y al contrario de lo que sucedía cuando la estimulación tenía lugar a través del receptor  $\beta$ -adrenérgico, los niveles alcanzados fueron significativamente más elevados ( $p < 0.001$ ) en corteza cerebral que en hipocampo. Estos datos son coincidentes con los resultados obtenidos por Jonhson y Minneman (1987), en los que se observó que la respuesta del AMP cíclico a la activación  $\alpha_1$ -adrenérgica en el hipocampo es mínima o nula. Por otra parte, esta disparidad en la actividad adenilato ciclase acoplada al adrenoceptor  $\alpha_1$  podría sugerir la presencia de diferentes subtipos del adrenoceptor en cada una de las estructuras anatómicas.

En esta situación, la preincubación durante 10 minutos con tacrina  $1 \mu\text{M}$  no alteró las curvas concentración-respuesta de la formación de AMP cíclico tras la estimulación de los adrenoceptores  $\alpha_1$  con noradrenalina.

El hecho de que este fármaco no modifique en absoluto la respuesta de la adenilato ciclase a la activación  $\alpha_1$ -adrenérgica, nos hace pensar que los efectos de la tacrina sobre la acumulación del AMP cíclico tienen lugar a través de una acción específica sobre el sistema  $\beta$ -adrenérgico. Estos resultados, además apoyan la implicación de la neurotransmisión  $\beta$ -adrenérgica en las mejorías cognoscitivas producidas por la tacrina.

Por último, y dado que la estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica produce mayoritariamente la formación de fosfatos de inositol, como segundo mensajero, se estudió si la tacrina podía modificar esta respuesta funcional.

En este caso la incubación con noradrenalina de los miniprismas de corteza cerebral e hipocampo, premarcados con [ $^3\text{H}$ ]-inositol dió lugar, como era de esperar, a un aumento

significativo de los niveles de fosfatos de inositol. En este caso el pretratamiento de los tejidos con tacrina 1  $\mu$ M tampoco indujo modificaciones en la acumulación del segundo mensajero, si bien en ambos casos pudo observarse un ligero aumento en la acumulación de fosfatos de inositol, tras la incubación con tacrina. Este incremento encajaría con los estudios de Perry y cols (1988) que observaron que la tacrina tendía a aumentar la hidrólisis de fosfoinosítidos en corteza cerebral humana.

La ausencia de efectos de la tacrina sobre la acumulación de fosfatos de inositol y sobre la estimulación de la formación de AMP cíclico tras la estimulación  $\alpha_1$ -adrenérgica permite descartar una actividad sobre estos receptores. Asimismo, estos datos sugieren que la efectividad de la tacrina para producir mejorías sobre los procesos de consolidación de memoria reciente puede tener un componente adrenérgico, si bien, éste será específico de los receptores  $\beta$ .

En conclusión, el perfil farmacológico de la tacrina, un fármaco potencialmente útil en el tratamiento de las deficiencias cognoscitivas asociadas al envejecimiento y procesos patológicos asociados, es muy complejo y puede abarcar acciones no sólo referidas a mejorías del sistema colinérgico.

Los resultados obtenidos junto con otros estudios que demuestran que la alteración de la funcionalidad del adrenoceptor  $\beta$  puede afectar las funciones cognoscitivas apoyan la idea de que el sistema de neurotransmisión  $\beta$  adrenérgico juega un papel crucial pero complejo, en los procesos de memoria y aprendizaje, de forma que parece existir una convergencia en un mecanismo común para mejorar los déficits cognoscitivos asociados al envejecimiento que se centra en el sistema  $\beta$  adrenérgico a nivel hipocámpico. Esto sugiere que el equilibrio correcto de este sistema de neurotransmisión y de su respuesta a nivel intracelular es crucial para el mantenimiento de un correcto procesamiento de la información en los procesos de consolidación de la memoria a corto plazo. Más aún, cada vez existen más datos a favor de una interrelación entre los sistemas noradrenérgico y colinérgico en el sistema nervioso central, y se ha sugerido que la interrelación entre los sistemas colinérgico y noradrenérgico centrales estaría implicada en procesos de plasticidad neural y de memoria y aprendizaje.

La demostración de la existencia de marcadas alteraciones en sistemas de neurotransmisión catecolaminérgicos y peptidérgicos con el envejecimiento ha desarrollado un interés cada vez mayor en farmacoterapias no restringidas a la mejoría de la neurotransmisión colinérgica para restablecer la función cognoscitiva. Así pues, la acción de la tacrina sobre la actividad adenilato ciclase acoplada a la activación del adrenoceptor  $\beta$  parece depender de un efecto directo sobre la actividad de alguno de los componentes de este sistema de transducción de señal. Tal efecto no parece depender de la interacción de la tacrina con la subunidad catalítica ni de la acción directa del derivado de la 4-aminopiridina sobre el adrenoceptor  $\beta$ . El efecto de la tacrina puede estar parcialmente relacionado con la influencia indirecta del sistema colinérgico, si bien tal influencia no se manifiesta en todas las regiones estudiadas. Resulta sin embargo sorprendente que en aquellas regiones en las que el componente colinérgico parece existir, los efectos de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico acoplado al adrenoceptor  $\beta$  no son reproducibles mediante otro potente anticolinesterásico como es la fisostigmina. Ello podría ser quizá debido a la acción diferencial de ambos compuestos sobre otros componentes de la neurotransmisión colinérgica como la capacidad de la tacrina, no compartida por la fisostigmina de interactuar de forma alostérica con los receptores muscarínicos centrales.



## **CONCLUSIONES**



1. La administración de tacrina inmediatamente después del entrenamiento, mejoró la retención de las ratas adultas en la prueba de evitación pasiva de un único ensayo.
2. Dado el protocolo de inyección utilizado, la tacrina modificó únicamente el proceso de consolidación de la memoria pero no la adquisición del hábito aversivo.
3. A nivel neuroquímico, la inyección intraperitoneal de tacrina redujo la formación de AMP cíclico en condiciones basales, pero este efecto no se obtuvo en animales adultos tras la inhibición de la fosfodiesterasa. Por tanto, la tacrina podría ejercer su acción sobre los procesos de degradación del AMP cíclico, cuando éstos están alterados como sucede en el envejecimiento.
4. La tacrina disminuyó la formación de AMP cíclico tras la activación de la adenilato ciclase a nivel del adrenoceptor  $\beta$  con isoprenalina en todos los grupos experimentales, revelando una acción sobre el sistema de transducción acoplado al mismo.
5. El efecto de la tacrina sobre la formación de AMP cíclico ligada a la activación del adrenoceptor  $\beta$  fue reproducible en estudios *in vitro*.
6. La reducción de la actividad adenilato ciclase acoplada al adrenoceptor  $\beta$  no parece depender de la interacción directa del derivado de la 4-aminopiridina con este receptor, ya que el pretratamiento con tacrina produce un desplazamiento no paralelo hacia la derecha de la curva concentración-respuesta de la acumulación de AMP cíclico tras la estimulación con isoprenalina. Esto se confirma además con los experimentos realizados en la preparación de conducto deferente aislado de rata, donde el efecto es el mismo.
7. Asimismo, el efecto de la tacrina no se puede adscribir a una interacción con la subunidad catalítica del complejo adenilato ciclase, ya que la tacrina no modificó la curva de estimulación de la formación de AMP cíclico obtenida con forskolina.

8. Cuando se analizó la existencia de un posible componente colinérgico en la acción de la tacrina, se observó que ni la facilitación de la neurotransmisión colinérgica mediante un potente anticolinesterásico, como es la fisostigmina ni el bloqueo de receptores muscarínicos mediante atropina fueron capaces de producir *in vitro* ninguna modificación en la acumulación de AMP cíclico.
9. A nivel hipocámpico el efecto de la tacrina sobre el sistema de transducción acoplado al adrenoceptor  $\beta$  podría depender parcialmente de su efecto sobre el sistema colinérgico ya que la atropina lo previene parcialmente.
10. Sin embargo, no parece ser consecuencia simplemente de su actividad anticolinesterásica puesto que por una parte no es reproducible con fisostigmina y por otro lado no es potenciado por la combinación de ambas sustancias.
11. Así pues, el posible componente colinérgico en la acción de la tacrina sobre el sistema de transducción acoplado al adrenoceptor  $\beta$  parece depender de su acción directa sobre receptores muscarínicos, más que de su acción como inhibidor de la colinesterasa a nivel hipocámpico, mientras que el componente colinérgico no es evidenciable en corteza cerebral.
12. La tacrina no ejerce ningún efecto sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, como se evidencia por la ausencia de modificaciones en la formación de los segundos mensajeros acoplados a este receptor.
13. En conclusión, la eficacia terapéutica de la tacrina, probablemente no se deba únicamente a sus propiedades anticolinesterásicas, sino que pueda depender de acciones neuroquímicas diversas a nivel central, entre las que podría encontrarse un efecto sobre el sistema de transducción acoplado al adrenoceptor  $\beta$ . Por otro lado nuestros resultados apoyan la participación del adrenoceptor  $\beta$  en los procesos de memoria reciente y sugieren que el sistema adenilato ciclase acoplado a este receptor pudiera ser un eslabón primario en la cadena de eventos neuroquímicos que se activan en el hipocampo tras la experiencia novedosa.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abercrombie ED, Zigmond MJ (1989). Partial injury to central noradrenergic neurons: reduction of tissue norepinephrine content is greater than reduction of extracellular norepinephrine measured by microdialysis. *J Neurosci*, 9:4162-7.
- Adem A, Jossan SS, Oreland L (1989). Tetrahydroaminoacridine inhibits human and rat brain monoamine oxidase. *Neurosci Lett*, 107:313-7.
- Aigner TG, Mishkin M (1986). The effects of physostigmine and scopolamine on recognition memory in monkeys. *Behav Neural Biol*, 45:81-7.
- Albin MS, Young AB, Penney JB (1988). Tetrahydro-9-aminoacridine (THA) interacts with the phencyclidine (PCP) receptor site. *Neurosci Lett*, 88:303-7.
- Alquist RP (1948). A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, 153:586-600.
- Arch JRS (1989). The brown adipocyte  $\beta$ -adrenoceptor. *Proc Nutr Soc*, 48:215-23.
- Arch JRS, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody V, Wilson C, Wilson S (1984). Atypical  $\beta$ -adrenoceptor on brown adipocytes as target for antiobesity drugs. *Nature*, 309:163-5.
- Arnsten AFT, Goldman-Rakic PS (1985). Alpha<sub>2</sub>-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science*, 230:1273-6.
- Arnsten AFT, Goldman-Rakic PS (1987). Noradrenergic mechanism in age-related cognitive decline. *J Neural Transm, [Suppl 24]*:317-24.
- Arnsten AFT, Goldman-Rakic PS (1990). Analysis of alpha<sub>2</sub>-adrenergic agonist effects on the delayed nonmatch-to-sample performance of aged rhesus monkeys. *Neurobiol Aging*, 11:583-90.

- Arnsten AFT, Leslie FM (1991). Behavioral and receptor binding analysis of the  $\alpha_2$ -adrenergic agonist 5-bromo-6-[2-imidazoline-2-yl amino] quinoxaline (UK-14304): evidence for cognitive enhancement at an  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtype. *Neuropharmacology*, 30 (12A):1279-89.
- Arnsten AFT, Cai JX, Goldman-Rakic PS (1988). The alpha-2 adrenergic agonist guanfacine improves memory in aged monkeys without sedative or hypotensive side effects: Evidence for alpha-2 receptor subtypes. *J Neurosci*, 8:4287-98.
- Banerji TK, Parkening TA, Collins TJ (1984). Adrenomedullary catecholaminergic activity increases with age in male laboratory rodents. *J Gerontol*, 39:264-8.
- Baratti CM, Huygens P, Miño J, Merlo A, Gardella J Jr (1979). Memory facilitation with posttrial injection of oxotremorine and physostigmine in mice. *Psychopharmacology*, 64:85-8.
- Barnes CA (1988). Aging and the physiology of spatial memory. *Neurobiol Aging*, 9:563-8.
- Barnes CA (1990). Animal models of age-related cognitive decline. En: Boller F, Grafman J, eds. *Handbook of Neuropsychology*. Elsevier Science Publishers BV, New York, 169-96.
- Barnett DB, Rugg EL, Nahorski SR (1978). Direct evidence of two types of  $\beta$ -adrenoceptor binding site in lung tissue. *Nature*, 273:166-8.
- Bartus RT, Dean RL (1985). Developing and utilizing animal models in the search for an effective treatment for age-related memory disturbances. En: Gottfries GG, ed. *Normal aging, Alzheimer's disease and senile dementia*. Editions de l'Université de Bruxelles, Bruselas, 231-67.
- Bartus RT, Dean RL (1987). Animal models for age-related memory disturbances. En: Alan R Liss, Inc. *Animals models of dementia*. New York, 69-79.

- Bartus RT, Dean RL (1990). Effects of cholinergic and adrenergic enhancing drugs on memory in the aged monkeys. En: Giacobini E, Becker R, eds. Current research in Alzheimer's disease. Taylor & Francis, New York.
- Bartus RT, Dean RL, Goas JA, Lippa AS (1980). Age-related changes in passive avoidance retention: modulation with dietary choline. *Science*, 209:301-3.
- Bartus RT, Dean III RL, Beer B, Lippa AS (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric dysfunction. *Science*, 217:408-17.
- Bartus RT, Dean III RL, Beer B (1983). An evaluation of drugs for improving memory in aged monkeys: Implications for trials in humans. *Psychopharmac Bull*, 19:168-84.
- Beani L, Tangenelli S, Antonelli T, Bianchi C (1986). Noradrenergic modulation of cortical acetylcholine release is both direct and gamma-aminobutyric acid-mediated. *J Pharmac Exp Ther*, 236:230-6.
- Bear MF, Singer W (1986). Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline. *Nature (Lond)*, 320:172-6.
- Beatty WW, Butters N, Janowsky DS (1986). Patterns of memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypotheses of dementia. *Behav Neural Biol*, 45:196-211.
- Beatty WW, Salmon DP, Butters N, Heindel WC, Granholm EL (1988). Retrograde amnesia in patients with Alzheimer's disease or Huntington's disease. *Neurobiol Aging*, 9:181-6.
- Beavo Ev, Rogers NL, Crofford OB, Hardman JG, Sutherland EW, Newman EV (1970). Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. *Mol Pharmacol*, 6 (6):597-603.

- Becker RE, Giacobini E (1988). Mechanisms of cholinesterase inhibition in senile dementia of the Alzheimer type: clinical, pharmacological and therapeutic aspects. *Drug Dev Res*, 12:163-95.
- Bergstrom DA, Kellar KJ (1979). Adrenergic and serotonergic receptor binding in rat brain after chronic desmethylimipramine treatment. *J Pharmac Exp Ther*, 209:256-61.
- Berridge MJ (1984). Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J*, 220:345-60.
- Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR (1982). Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem J*, 206:587-95.
- Berridge MJ, Irvine RF (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312:315-21.
- Berridge MJ, Irvine RF (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341:197-205.
- Bilski A, Halliday SE, Fitzgerald JD, Wale J (1983). The pharmacology of the  $\beta_2$ -selective adrenoceptor antagonist ICI 118,551. *J Cardiovasc Pharmac*, 5:430-7.
- Birch PJ, Fillenz M (1986). Muscarinic receptor activation inhibits both release and synthesis of noradrenaline in rat hippocampal synaptosomes. *Neurochem Int*, 8:171-7.
- Birnbaumer L (1990). Transductions of receptor signal into modulation of effector activity by G proteins: the first 20 years or so. *FASEB J*, 4:3068-78.
- Bojanic D, Jansen JD, Nahorski S, Zaagsma J (1985). Atypical characteristics of the  $\beta$ -adrenoceptor mediating cyclic AMP generation and lipolysis in the rat adipocyte. *Br J Pharmac*, 84:131-7.

- Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M (1982). Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus caeruleus) in senile dementia. *Neurology*, 32:164-8.
- Boyajian CL, Leslie FM (1987). Pharmacological evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential binding properties of [<sup>3</sup>H]rauwolscine and [<sup>3</sup>H]idazoxan in rat brain. *J Pharmac Exp Ther*, 241:1092-8.
- Boyajian CL, Loughlin SE, Leslie FM (1987). Anatomical evidence for alpha-2 adrenoreceptor heterogeneity: differential autoradiographic distribution of [<sup>3</sup>H]rauwolscine and [<sup>3</sup>H]idazoxan in rat brain. *J Pharmac Exp Ther*, 241:1079-91.
- Bowen DM, Steele JE, Lowe SL, Palmer AM (1990). Tacrine in relation to amino acid transmitters in Alzheimer's disease. *Adv Neurol*, 51:91-6.
- Brandeis R, Dachir S, Sapir M, Levy A, Fischer A (1990). Reversal of age-related cognitive impairments by an M1 cholinergic agonist, AF102B. *Pharmacol Biochem Behav*, 36:89-95.
- Brann MR, Collins RM, Spiegel A (1987). localization of mRNAs encoding the  $\alpha$ -subunit of signal transducing G-proteins within rat brain and among peripheral tissues. *FEBS Lett*, 222:191-8.
- Brodde O-E (1982). Homogeneous class of beta-1 adrenergic receptors in rat kidney. *Biochem Pharmac*, 31:1743-7.
- Brown BL, Albano JDM, Elkins RP, Sgherzi AM (1971). A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *Biochem J*, 121:561-2.

- Bures J, Bohdanecky Z, Weiss T (1962). Physostigmine induced hippocampal theta activity and learning in rats. *Psychopharmacologia*, 3:254-63.
- Buresova O, Bures J, Bohdanecky Z, Weiss T (1964). Effect of atropine on learning, extinction, retention and retrieval in rats. *Psychopharmacologia*, 5:255-63.
- Butterfield DA, Palmieri DA (1990). Spin-labelling studies of the interaction of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroaminoacridine (THA), a proposed drug for the treatment of Alzheimer's disease, with erythrocyte membranes. *Free Radic Res Commun*, 9:361-6.
- Buu NY, Devinski W (1990). Vesicular and ganglionic norepinephrine in the rat: progressive increase with age. *J Neurochem*, 54:620-6.
- Buyukuyosal RL, Wurtman RJ (1989). Tetrahydroaminoacridine but not 4-aminopyridine inhibits high-affinity choline uptake in striatal and hippocampal synaptosomes. *Brain Res*, 482: 371-5.
- Buzsáki G, Bickford RG, Ponomareff G, Thal LJ, Mandel R, Gage FH (1988). Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J Neurosci*, 8:4007-26.
- Buzsáki G, Kennedy B, Solt VB, Ziegler M (1990). Noradrenergic control of thalamic oscillation: the role of alpha-2-receptors. *Eur J Neurosci*, 3:222-9.
- Bylund DB (1985). Heterogeneity of alpha-2 adrenergic receptors. *Pharmac Biochem Behav*, 22:835-43.
- Bylund DB (1988). Subtypes of  $\alpha_2$ -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmac Sci*, 9:356-61.

- Bylund DB, Ray-Preiger C, Murphy TJ (1988). Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissues and cell lines containing only one subtype. *J Pharmac Exp Ther*, 245:600-7.
- Campi N, Todeschini GP, Scarzella L (1990). Selegiline versus L-acetylcarnitine in the treatment of Alzheimer-type dementia. *Clin Ther*, 12:306-14.
- Cantor EH, Greeberg LH, Weiss B (1981). Effect of long term changes in sympathetic nervous activity on the beta-adrenergic receptor adenylate cyclase complex of rat pineal gland. *Mol Pharmacol*, 19:21-6.
- Carlsson A (1987). Brain neurotransmitters in aging and dementia: similar changes across diagnostic groups. *Gerontology*, 33:159-216.
- Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH (1989). Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci*, 12:59-65.
- Cole G, Dobkins KR, Hansen LA, Terry RD, Saitoh T (1988). Decreased levels of protein kinase C in Alzheimer brain. *Brain Res*, 452:165-74.
- Corrodi H, Fuxe K, Hammer W, Sjoqvist F, Ungerstedt U (1967). Oxotremorine and central monoamine neurons. *Life Sci*, 6:2557-66.
- Cotecchia S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG, Kobilka BK (1988). Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster  $\alpha_1$ -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:7159-63.
- Court JA, Piggott MA, Perry EK (1990). Nicotine reduces the binding of [ $^3$ H]MK-801 to brain membranes, but not via the stimulation of high-affinity nicotinic receptors. *Brain Res*, 524:319-21.

- Court JA, Perry EK (1991). Dementia: the neurochemical basis of putative transmitter orientated therapy. *Pharm Ther*, 52:423-43.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983). Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219:1184-90.
- Crooke ST, Bennett CF (1989). Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C isoenzymes. *Cell Calcium*, 10:309-23.
- Cross AJ, Crow TJ, Johnson JA, Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE (1984). Studies on neurotransmitter receptor systems in neocortex and hippocampus in senile dementia of the Alzheimer type. *J Neurol Sci*, 64:109-17.
- Curley WH, Standaert FG, Dretchen KL (1994). Physostigmine inhibition of 3',5'-cyclic AMP phosphodiesterase from cat sciatic nerve. *J Pharmac Exp Ther*, 228:656-61.
- Challis RAJ, Leighton B, Wilson S, Thorby PL, Arch JRS (1988). An investigation of the  $\beta$ -adrenoceptor that mediates metabolic responses to the novel agent BRL 28410 in the rat soleus muscle. *Biochem Pharmac*, 37:847-950.
- Challis RAJ, Willcocks AL, Mulloy B, Potter BVL, Nahorski SR (1991). Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate-binding sites in rat cerebellum. *Biochem J*, 274:861-7.
- Chatellier G, Lacomblez L (1990). Tacrine (tetrahydroaminoacridine; THA) and lecithin in senile dementia of the Alzheimer type: a multicenter trial. *Br Med J*, 300:495-9.
- Cheney DL, Costa E (1977). Pharmacological implications of brain acetylcholine turnover measurements in rat brain nuclei. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 17:369-86.

- Cheung Y-D, Barnett DB, Nahorski SR (1982). [<sup>3</sup>H]Rauwolscine and [<sup>3</sup>H]yohimbine binding to rat cerebral and human platelet membranes: possible heterogeneity of  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Eur J Pharmac*, 84:79-85.
- Cheung Y-D, Barnett DB, Nahorski SR (1986). Heterogeneous properties of  $\alpha_2$ -adrenoceptors in particulate and soluble preparations of human platelet and rat and rabbit kidney. *Biochem Pharmac*, 25:3767-76.
- Choi RL, Roch M, Jenden DJ (1973). A regional study of acetylcholine turnover in rat brain and the effects of oxotremorine. *Proc West Pharmacol Soc*, 16:188-90.
- Christie JE, Shering A, Ferguson J, Glen AIM (1981). Physostigmine and arecoline: effects of intravenous infusions in Alzheimer's presenile dementia. *Br J Psychiat*, 138:46-50.
- Daly JW, Padgett W, Creveling CR, Cantacuzene D, Kirk KL (1981). Cyclic AMP-generating systems: regional differences in activation by adrenergic receptors in rat brain. *J Neurosci*, 1:49-59.
- Danielsson E, Eckernäs SA, Westlind-Danielsson A, Nordström O, Bartfai T, Gottfries GG, Wallin A (1988). VIP-sensitive adenylate cyclase, guanylate cyclase, muscarinic receptors, choline acetyltransferase and acetylcholine-esterase, in brain tissue afflicted by Alzheimer's disease/senile dementia of the Alzheimer type. *Neurobiol Ageing*, 9:153-62.
- Davenport CJ, Monyer H, Choi DW (1988). Tetrahydroaminoacridine selectively attenuates NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Eur J Pharmac*, 154:73-8.
- Davies JA, Jackson B, Redfern PH (1974). The effect of amantadine, L-DOPA, (+)-amphetamine and apomorphine on the acquisition of conditioned avoidance response. *Neuropharmacology*, 13:199-204.

- Davies P, Maloney AJF (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 25:1403.
- Davis JM, Janowsky D, Tamminga C, Smith RC (1978). Cholinergic mechanisms in schizophrenia, mania and depression. En: Jensen DJ, ed. *Cholinergic mechanisms and psychopharmacology*. Plenum Press, New York, 805-16.
- Davis RE, Callahan MJ, Downs DA (1988). Clonidine disrupts aged-monkey delayed response performance. *Drug Dev Res*, 12:279-86.
- De Keyser J, Ebinger G, Vauquelin G (1990). D<sub>1</sub>-dopamine receptor abnormality in frontal cortex points to a functional alteration of cortical cell membranes in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 47:761-3.
- De la Lande IS, Bentley GA (1955). Action of morphine and antagonists of the narcotic action of morphine on acetylcholine synthesis in brain. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 33:555-66.
- De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ (1980). A tertiary complex model explain the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 255:7108-17.
- Decker MW (1987). The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain ResRev*, 12:423-38.
- Decker MW, Gallagher M (1987). Scopolamine-disruption of radial arm maze performance: modification by noradrenergic depletion. *Brain Res*, 417:59-69.
- Decker MW, McGaugh JL (1989). Effects of concurrent manipulations of cholinergic and noradrenergic function on learning and retention in mice. *Brain Res*, 477:29-37.
- Deutsch JA (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science*, 174:788-94.

- Dewar D, Horsburgh K, Graham DI, Brooks DN, McCulloch J (1990). Selective alterations of high affinity [<sup>3</sup>H]forskolin binding sites in Alzheimer's disease: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res*, 511:241-8.
- Díaz-Toledo A, Jurkiewicz A (1990). Dissociation constants and relative efficacies estimated from the functional antagonism of  $\beta$ -adrenoceptor agonists on transmural stimulation in rat vas deferens. *Eur J Pharmac*, 191:157-65.
- Díaz-Toledo A, Jurkiewicz A (1991). Different mechanisms of action of agents acting on  $\beta$ -adrenoceptors in barium-stimulated and electrically-stimulated rat vas deferens. *Br J Pharmac*, 104:277-83.
- Dixon RAF, Kobilka BK, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, 321:75-9.
- Docherty JR, Hyland L (1986). Aging and  $\alpha$ -adrenoceptor function. *Trends Pharmac Sci*, 7:131-2.
- Docherty JR, O'Malley K (1983). An examination of age-related changes in pre- and post-synaptic  $\alpha$ -adrenoceptors in the rat isolated vas deferens. *Eur J Pharmac*, 95:171-6.
- Docherty JR, O'Malley K (1985). Ageing and  $\alpha$ -adrenoceptors. *Clin Sci*, 68 (Suppl 10):133s-6s.
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991). Model systems for the study of seven transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem*, 60:653-88.
- Dolezal V, Tucek S (1983). The effects of 4-aminopyridine and tetrodotoxin on the release of acetylcholine from rat striatal slices. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmac*, 323:90-5.

- Dolezal V, Tucek S (1991). Positive and negative effects of tacrine (tetrahydroamino acridine) and methoxytacrine on the metabolism of acetylcholine in brain cortical prisms incubated under "resting" conditions. *J Neurochem*, 56:1207-15.
- Dollery CT, Davies DS, Draffan GH, Dargie HG, Dean CR, Reid JL, Lare RA, Murray S (1975). Clinical pharmacology and pharmacokinetics of clonidine. *Clin Pharmac Ther*, 19:11-7.
- Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC (1986). CGP20712A: a useful tool for quantitating  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors. *Eur J Pharmac*, 130:137-9.
- Drachman DA, Leavitt J (1974). Human memory and the cholinergic system: A relationship to aging? *Arch Neurol*, 30:113-21.
- Drukarch B, Kits KS, van der Meer EG, Lodder JC, Stoof JC (1987). 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA), an alleged drug for the treatment of Alzheimer's disease, inhibits acetylcholinesterase activity and slow outward K<sup>+</sup> current. *Eur J Pharmac*, 141:153-7.
- Drukarch B, Leysen JE, Stoof JC (1988). Further analysis of the neuropharmacological profile of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA), an alleged drug for the treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci*, 42:1011-8.
- Dunnett SB, Evenden JL, Iversen SD (1988). Delay-dependent short-term memory deficits in aged rats. *Psychopharmacology*, 96:174-80.
- Dunnett SB, Everitt BJ, Robbins TW (1991). The basal forebrain-cortical cholinergic system: interpreting the functional consequences of excitotoxic lesions. *Trends Neurosci*, 14:371-6.
- Eagan TM, North RA (1985). Acetylcholine acts on m<sub>2</sub>-muscarinic receptors to excite rat locus coeruleus neurones. *Br J Pharmac*, 85:733-5.

- Eagger SA, Levy R, Sahakian BJ (1991). Tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet*, 337:989-92.
- Emorine LJ, Marullo S, Briand-Sutren M-M, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD (1989). Molecular characterization of the human  $\beta_3$ -adrenergic receptor. *Science*, 245:1118-21.
- Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Vivas NM, Marmol F, Badia A, Dierssen M (1993). Early environmental stimulation produces long lasting neurochemical changes on  $\beta$ -adrenoceptor transduction system. *Neurobiol Aging*, sometido a revisión.
- Everitt BJ, Robbins TW, Seldon NRW (1990). Functions of the locus coeruleus noradenergic system: a neurobiological and behavioural synthesis. En: Heal DJ, Marsden CA, eds. *The pharmacology of noradrenaline in central nervous system*. Oxford University Press, Oxford, 349-87.
- Farlow M, Gracon SI, Hershey LA, Lewis KW, Sadowsky CH, Dolan-Ureno J (1992). A controlled trial of tacrine in Alzheimer's disease. *JAMA*, 268 (18):2523-9.
- Fibiger HC (1991). Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci*, 14 (6):220-3.
- Fischer W, Gage FH, Björklund A (1989). Degenerative changes in forebrain cholinergic nuclei correlate with cognitive impairments in aged rats. *Eur J Neurosci*, 1:34-45.
- Fleming WW, Westfall DP, De la Lande IS, Jellet LB (1972). Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J Pharmac Exp Ther*, 181:339-45.

- Flicker C, Dean RL, Watkins DL, Fisher SK, Bartus RT (1983). Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 19:309-12.
- Flood JF, Smith GE, Cherkin A (1984). Memory retention: effect of prolonged cholinergic stimulation in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 20:161-3.
- Flood JF (1988). Effect of acute arecoline, tacrine and arecoline+tacrine post-training administration on retention in late middle-aged mice. *J Gerontol*, 43:B54-6.
- Flynn DD, Suárez A, Cordoves A (1987). Differential regulation of muscarinic receptor subtypes in the cerebral cortex by chronic THA. *Soc Neurosci Abstracts* 13:726.
- Flynn DD, Mash DC (1989). Multiple *in vitro* interactions with and differential *in vivo* regulation of muscarinic receptor subtypes by tetrahydroaminoacridine. *J Pharmac Exp Ther*, 210:7-14.
- Forsyth DR, Wilcock GK, Morgan RA, Truman CA, Ford JM, Roberts CJ (1989). Pharmacokinetics of tacrine hydrochloride in Alzheimer's disease. *Clin Pharmac Ther*, 46:634-41.
- Freedman LS, Chuchi T, Glodstein M, Axelrod R, Fish I, Dancis J (1972). Changes in human serum dopamine- $\beta$ -hydroxylase activity with age. *Nature (Lond)*, 236:310-1.
- Freeman SE (1979). Cholinergic mechanisms in heart: interactions with 4-aminopyridine. *J Pharmac Exp Ther*, 250:573-81.
- Freeman SE, Turner RJ (1970). Facilitatory drug action on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *J Pharmac Exp Ther*, 174:550-9.

- Freeman SE, Dawson RM (1991). Tacrine: a pharmacological review. *Prog Neurobiol*, 36:257-77.
- Freeman SE, Lau WM, Szilagyi M (1988). Blockade of a cardiac K<sup>+</sup> channel by tacrine: interactions with muscarinic and adenosine receptors. *Eur J Pharm*, 154:59-65.
- Freilich J, Weiss B (1983). Altered adaptative capacity of brain catecholaminergic receptors during aging. En: Samuel D, Algeri S, Gershon S, Grimm VE, Toffano G, eds. *The aging of the brain*. Raven Press, New York, 277-300.
- Furiuchi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P<sub>400</sub>. *Nature*, 342:32-8.
- Gallagher M, Pelleymounter MA (1988). Spatial learning deficits in old rats: a model for memory decline in the aged. *Neurobiol Aging*, 9:549-56.
- Gallagher M, Burwell RD, Kodsi MH, McKinney M, Southerland S, Vella-Rountree L, Lewis MH (1990). Markers for biogenic amines in the aged rat brain: relationship to decline in spatial learning ability. *Neurobiol Aging*, 11:507-14.
- García-Sainz MJ, Hernández-Sotomayor SMT (1985). Adrenergic regulation of gluconeogenesis: possible involvement of two mechanisms of signal transduction in α<sub>1</sub>-adrenergic action. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 82:6727-30.
- Gauthier S, Bouchard R, Lamontagne A, Bailey R, Bergman H, Ratner J, Tesfaye Y, St-Martin M, Bacher Y, Carrier L, Charbonneau R, Clarfield AM, Collier B, Dastoor D, Gauthier L, Germain M, Kissel C, Krieger M, Kushnir S, Masson H, Morin J, Nair V, Neirinck L, Suissa S (1990). Tetra-hydroaminoacridine-lecithin combination treatment in patients with intermediate-stage Alzheimer's disease: results of a Canadian double-blind, crossover, multicenter study. *N Engl J Med*, 322:1272-6.

- Gauthier S, Masson H, Gauthier L, Bouchard R, Bailey P, Becker R, Collier B, Gaytin D, Kennedy J, Kissel C, Lamontagne A, Nair NPV, Ratner J, St-Martin M, Morin J, Suissa S, Tesfaye Y, Vida S (1988). Tetrahydroaminoacridine and lecithin in Alzheimer's disease. En: Giacobini E, Becker R, eds. Current research in Alzheimer therapy. Taylor & Francis, New York, 237-45.
- Gelbmann CM, Müller WE (1990). Specific decrease of high-affinity agonist states of alpha<sub>2</sub>-adrenoceptors in the aging mouse brain. *J Neural Transm [GenSect]*, 79:131-6.
- Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC (1985). Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science*, 230:1179-81.
- Gehlert DR (1986). Regional modulation of [<sup>3</sup>H]forskolin binding in the rat brain by guanylyl-5'-imidodiphosphate and sodium fluoride: comparison with the distribution of guanine nucleotide binding sites. *J Pharmac Exp Ther*, 239:952-8.
- Gehlert DR, Wamsley JK (1986). Autoradiographic localization of guanine nucleotide binding sites in the rat brain using <sup>3</sup>H-guanylyl-5'-imidodiphosphate. *Eur J Pharmac*, 106:223-5.
- Gershon S (1960). Blocking effect of tetrahydroaminacrin on a new psychotomimetic agent. *Nature (Lond)*, 186:1072-3.
- Gershon S, Shaw FH (1958). Tetrahydroaminacrin as a decurarizing agent. *J Pharm Pharmacol*, 10:638-41.
- Gilman AG (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, 36:577-9.
- Gilman AG (1987). G proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu Rev Biochem*, 56:615-49.

- Goldman-Rakic PS, Brown RM (1981). Regional changes of monoamines in cerebral cortex and subcortical structures of aging rhesus monkeys. *Neuroscience*, 6:177-87.
- Gray JA, Enz A, Spiegel R (1989). Muscarinic agonists for senile dementia: past experience and future trends. *Trends Pharm Sci*, Suppl Subtypes of muscarinic receptors IV:85-8.
- Greenberg LH (1986). Regulation of brain adrenergic receptors during aging. *Fed Proc*, 45:55-9.
- Greenberg LH, Brunswick DJ, Weiss B (1985). Effect of age on the rate of recovery of beta-adrenergic receptors in rat brain following desmethylimipramine-induced subsensitivity. *Brain Res*, 328:81-8.
- Greenberg LH, Weiss B (1983). Neuroendocrine control of catecholamine receptors in aging. In: Agnoli A, Crepaldi G, Spano PF, Trabucchi M, eds. *Aging brain and ergotalkaloids*. Raven Press, New York, 37-52.
- Guillemette G, Balla J, Baukal AJ, Spat A, Catt K (1987). Intracellular receptors for inositol 1,4,5-trisphosphate in angiotensin II target tissues. *J Biol Chem*, 262:1010-6.
- Gundlach AL, Urosevic A (1989). Autoradiographic localization to particulate cyclic AMP-dependent protein kinase in mammalian brain using [<sup>3</sup>H]cyclic AMP: implications for organization of second messenger systems. *Neuroscience*, 29:695-714.
- Hallak M, Giacobini E (1986). Relation of brain regional physostigmine concentration to cholinesterase activity and acetylcholine and choline levels in rat. *Neurochem Res*, 11:1037-48.
- Hallak M, Giacobini E (1989). Physostigmine, tacrine and metrifonate: the effect of multiple doses on acetylcholine metabolism in rat brain. *Neuropharmacology* 28:199-206.

- Halliwell JV, Grove EA (1989). 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) blocks agonist-induced potassium conductance in rat hippocampal neurons. *Eur J Pharmac*, 163:369-72.
- Han C, Abel PW, Minneman KP (1987a). Heterogeneity of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors revealed by chlorethylclonidine. *Mol Pharmac*, 32:505-10.
- Han C, Abel PW, Minneman KP (1987b).  $\alpha_1$ -Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in smooth muscle. *Nature*, 329:333-5.
- Handberg GM, Davis EA, Hall S, Molenaar P, Summers RJ, Pennefather JN (1988).  $\beta$ -Adrenoceptors in circular and longitudinal myometrial membranes and in lung membranes from dioestrus and post-partum guinea-pigs. *Clin Exp Pharmac Physiol*, 15:681-93.
- Handelmann GE, Nevins ME, Mueller LL, Arnolde SM, Cordi AA (1989). Milacemide, a glycine prodrug, enhances performances of learning tasks in normal and anesthetic rodents. *Pharmac Biochem Behav*, 34:823-8.
- Harms HH, Zaagsma J, De Vente J (1977). Differentiation of  $\beta$ -adrenoceptors in right atrium, diaphragm and adipose tissue of the rat using stereoisomers of propranolol, nifenalol and practolol. *Life Sci*, 21:123-8.
- Haroutunian VH, Kanof PD, Davis KL (1985). Pharmacological alleviation of cholinergic lesion induced memory deficits in rats. *Life Sci*, 37:945-52.
- Haroutunian VH, Kanof PD, Tsuboyama GK, Davis KL (1990). Restoration of cholinomimetic activity of clonidine in cholinergic plus noradrenergic lesioned rats. *Brain res*, 507:261-6.
- Haroutunian VH, Tsuboyama GK, Kanof PD, Davis KL (1988). Pharmacological consequences of cholinergic plus noradrenergic lesions. En: Giacobini E, Becker R, eds. *Current research in Alzheimer therapy*. Taylor & Francis, New York, 63-71.

- Harrell LE, Callaway R, Morere D, Falgout J (1990). The effect of long-term physostigmine administration in Alzheimer's disease. *Neurology*, 40:1350-3.
- Harrison PJ, Barton AJL, Najlerahim A, Pearson RCA (1990). Distribution of a kainate/AMPA receptor mRNA in normal and Alzheimer brain. *Neuro Report*, 1:149-52.
- Harrison PJ, Barton AJL, McDonald B, Pearson RCA (1991a). Alzheimer's disease: specific increases in a G protein subunit ( $G_{s\alpha}$ ) mRNA in hippocampal and cortical neurons. *Mol Brain Res*, 10:71-81.
- Harrison PJ, Proctor AW, Barton AJL, Lowe SL, Najlerahim A, Bertolucci PHF, Bowen DM, Pearson RCA (1991b). Terminal coma affects messenger RNA detection in post mortem human temporal cortex. *Mol Brain Res*, 9:161-4.
- Hartvig P, Askmark H, Aquilonius SM, Wiklund L, Lindstrom B (1990). Clinical pharmacokinetics of intravenous and oral 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine, tacrine. *Eur J Clin Pharmac*, 38:259-63.
- Harvey AR, Rowan EG (1990). Effects of tacrine, aminopyridines and physostigmine on acetylcholinesterase, acetylcholine release and potassium currents. *Adv Neurol*, 51:227-33.
- Hearst E (1959). Effects of scopolamine on discriminated responding in rat. *J Pharmac Exp Ther*, 126:349-58.
- Heilbronn E (1961). Inhibition of cholinesterases by tetrahydroaminacrin. *Acta Chem Scand*, 15:1386-90.
- Heimans RLH, Fennessy MR, Gaff GA (1971). Metabolism of morphine N-oxide. *J Pharm Pharmac*, 23:831-6.

- Herz A (1960). Die bedeutung der bahnung für die wirkung von skopolamin und ähnlichen substanz für bedingte reaktionen. Z Biol, 112:104-12.
- Ho AKS, Freeman SE (1965). Anticholinesterase activity of tetrahydroaminacrine and succinylcholine hydrolysis. Nature (Lond), 205:1118-9.
- Hedges H, Ribeiro AM, Gray JA, Marchbanks RM (1990). Low dose tetrahydroaminoacridine (THA) improves cognitive function but does not affect brain acetylcholines in rats. Pharmac Biochem Behav, 36:291-8.
- Hofman A, Rocca WA, Brayne C, Breteler MMB, Clarke M, Cooper B, Copeland JRM, Dartigues JF, da Silva Droux A, Hagnell O, Heeren TJ, Engedal K, Jonker C, Lindesay J, Lobo A, Mann AH, Mölsä PK, Morgan K, O'Connor DW, Sulkava R, Kay DWK, Amaducci L (1991). The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Int J Epidemiology, 20:736-48.
- Hollander E, Davidson M, Mohs RC, Horvath TB, Davis BM, Zemishlany Z, Davis KL (1987). RS 86 in the treatment of Alzheimer's disease: cognitive and biological effects. Biol Psychiat, 22:1067-78.
- Hollingsworth EB, Sears EB, de la Cruz RA, Gusovsky F, Daly JW (1986). Accumulations of cyclic AMP and inositol phosphates in guinea pig cerebral cortical synaptoneuroosomes: enhancement by agents acting at sodium channels. Biochim Biophys Acta, 883:15-25.
- Honer WG, Prohovnik I, Smith G, Lucas LR (1988). Scopolamine reduces frontal cortex perfusion. J Cereb Blood Flow Metab, 8:635-41.
- Horsburgh K, Dewar D, Graham DI, McCulloch J (1991). Autoradiographic imaging of [<sup>3</sup>H]forbol-12,13-dibutyrate binding to protein kinase C in Alzheimer's disease. J Neurochem, 56:1121-9.

- Hourani SMO, Nicholls J, Lee BSS, Halfhide EJ, Kitchen I (1993). Characterization and ontogeny of P<sub>1</sub>-purinceptors on rat vas deferens. *Br J Pharmac*, 108:754-8.
- Huang K-P (1989). The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci*, 12:425-32.
- Hunt RD, Minderaa RB, Cohen DJ (1985). Clonidine benefits children with attention deficit disorder and hyperactivity: report of a double-blind placebo-crossover therapeutic trial. *J Am Acad Child Psychiat*, 24:617-29.
- Hunter AJ (1989). Serotonergic involvement in learning and memory. *Biochem Soc Trans*, 17:79-81.
- Hunter AJ, Murray TK, Jones JA, Cross AJ, Green AR (1989). The cholinergic pharmacology of tetrahydroaminoacridine. *Br J Pharmac*, 98:79-86.
- Ikeda M, Dewar D, McCulloch J (1991). Preservation of [<sup>125</sup>I]galanin binding sites despite loss of cholinergic neurons to the hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 568 (1-2):303-6.
- Ince P, Irving D, McArthur F, Perry RH (1991). Quantitative neuropathological study of Alzheimer-type pathology in the hippocampus: comparison of senile dementia of Alzheimer type, senile dementia of Lewy body type, Parkinson's disease and non-demented elderly control patients. *J Neurol Sci*, 106:142-52.
- Izquierdo I (1991). Role of NMDA receptors in memory. *Trends Pharm Sci*, 12:128-9.

- Jenike MA, Albert M, Baer L, Gunther J (1990). Oral physostigmine as treatment for primary degenerative dementia: a double-blind placebo-controlled inpatient trial. *J Geriat Psychiatry Neurol*, 3:13-6.
- Johnson RD, Minneman KP (1987). Differentiation of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors linked to phosphatidylinositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain. *Molec Pharmac*, 31:239-46.
- Joly D, Sanger DJ (1988). The effect of clonidine on delayed response performance in cebus monkeys. En: Cognition enhancers, from animals to man. Second international symposium on preclinical strategies in psychopharmacology. Paris, abstract n° 15.
- Jones CR, Hoyer D, Palacios JM (1990). Adrenoceptor autoradiography. En: The pharmacology of noradrenaline in the central nervous system. Heal DJ, Marsden CA, eds. Oxford University Press, Londres, 41-75.
- Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, Valle JR (1971). Contractile reserve after maximum doses of full agonists on the rat vas deferens. *Pharmacology*, 5:129-44.
- Kametani H, Bresnahan EL, Chachich ME, Spangler EL, Ingram DK (1989). Comparison of retention performance between young rats with fimbria-fornix lesions and aged rats in a 14-unit T-maze. *Behav Brain Res*, 35:253-63.
- Karpiak SE, Kirchmer M, Rapaport MM (1976). Reserpine inhibition of passive avoidance behavior: time and dose responses. *Res Commun Psychol Psychiatr Behav*, 1: 149-54.
- Kaumann AJ (1989) Is there a third heart  $\beta$ -adrenoceptor?. *Trends Pharmac Sci*, 10:316-20.
- Kaye WH, Sitaram N, Weingartner H, Ebert MH, Smallberg S, Gillin JC (1982). Modest facilitation of memory in dementia with combined lecithin and anticholinesterase treatment. *Biol Psychiatry*, 17:275-80.

- Kerwin JM, Morris CM, Perry Rh, Perry EK (1991). Distribution of nerve growth factor receptor immunoreactivity in the human hippocampus. *Neurosci Lett*, 121:178-82.
- Kitamura Y, Nomura Y, Segawa T (1985). Possible involvement of inhibitory GTP binding regulatory protein in  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated inhibition of adenylate cyclase activity in rat cerebral cortical membranes of rats.
- Kobilka BK, Dixon RAF, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Sigal IS, Yang-Feng TL, Franke UY, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987a). cDNA for the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor: a protein with multiple membrane spanning domains and encoded by a gene whose location is shared with that of the receptor for platelet derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:46-50.
- Kobilka BK, Frielle T, Dohlman HG, Bolanowski MA, Dixon RAF, Keller P, Caron MG, Lefkowitz RJ (1987b). Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster  $\beta_2$ -adrenergic receptor and their putative promoter regions. *J Biol Chem*, 262:7321-7.
- Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Franke UY, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW (1987c). Cloning, sequencing and expression of the gene coding for the human platelet  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. *Science*, 240:1310-6.
- Koh J-Y, Yang LL, Cotman CW (1990).  $\beta$ -Amyloid protein increases the vulnerability of cultured neurons to excitotoxic damage. *Brain Res*, 533:315-20.
- Kruglikov RI (1982). On the interaction of neurotransmitter systems in processes of learning and memory. En: Marsan CA, Matthies H, eds. *Neural plasticity and memory formation*. Raven, New York, 339-51.

- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science*, 244:1558-64.
- Kumar V (1988). Efficacy and side effects of THA in Alzheimer's disease patients. In: Giacobini E, Becker R, eds. *Current research in Alzheimer therapy*. Taylor & Francis, New York, 225-9.
- Kumar V (1989). Adverse affects of cholinergic agents in Alzheimer's disease patients. *APA Abstracts*.
- Kumar V, Becker RE (1989). Clinical pharmacology of tetrahydroaminoacridine: a possible therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Int J Clin Pharmac Ther Toxicol*, 27 (10):478-85.
- Kuno N, Kamisaki Y, Itoh T (1990). Inhibition of cyclic AMP by alpha-2-adrenoceptors in the rat cerebral cortex. *Eur J Pharmac*, 176:281-7.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 215:597-8.
- Langer SZ (1974). Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmac*, 23:1793-800.
- Laporte J, Jané F, Valdecasas FG (1966). Some aspects of the rat and guinea-pig isolated vas deferens preparation. *Med Pharmac Exp*, 15:483-90.
- Largent BL, Jones DT, Reed RR, Pearson RCA, Snyder SM (1988). G protein mRNA mapped in rat brain by *in situ* hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:2864-8.
- Laurenza A, Sutkowski EM, Seamon KB (1989). Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmac Sci*, 10:442-7.

- Lemmer B, Barneier H, Schmidt S, Lang PH (1987). On the daily variation in the beta-receptor-adenylate cyclase-cAMP-phosphodiesterase system in rat forebrain. *Chronobiol Int*, 4 (4):469-75.
- Lemmer B, Langer L, Ohm T, Bohl J (1993). Beta-adrenoceptor density and subtype distribution in cerebellum and hippocampus from patients with Alzheimer's disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac*, 347:214-9.
- Leslie FM, Loughlin SE, Stenberg DB, McGaugh JL, Young LE, Zornetzer SF (1985). Noradrenergic changes and memory loss in aged mice. *Brain Res*, 359:292-9.
- Levy R, Little A, Chuaqui-Kidd P, Reith M (1983). Early results from double blind, placebo controlled trial of high dose phosphatidylcholine in Alzheimer's disease. *Lancet* 1:987-8.
- Lewander T, Joh TH, Reis DJ (1977). Delayed activation in central noradrenergic neurons and induction in adrenal medulla elicited by stimulation of central cholinergic receptors. *J Pharmac Exp Ter*, 156:70-5.
- Litosch I (1987). Guanine nucleotide and NaF stimulation of phospholipase C activity in rat cerebral-cortical membranes. *Biochem J*, 244:35-40.
- Little A, Levy R, Chuaqui-Kidd P, Hand D (1985). A double blind placebo controlled trial of high-dose lecithin in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 48:736-42.
- Loiacono RE, Mitcheson FJ (1990). Effect of nicotine and tacrine on acetylcholine release from rat cerebral cortical slices. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac*, 342:31-5.
- Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung W-Y, Schwinn DA, Yang-Feng TL, Brownstein M, Lefkowitz RJ, Caron MG (1991). Molecular cloning and expression of the cDNA for the  $\alpha_{1A}$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 266:6365-9.

- Lotti VJ, Chang RSL, Kling P (1980).  $\beta_2$ -Selective adrenergic responses in the field-stimulated rat vas deferens. *Eur J Pharmac*, 68:385-6.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-75.
- Luine V, Bowling D, Hearns M (1990). Spatial memory deficits in aged rats: contributions of monoaminergic systems. *Brain Res*, 537:271-8.
- MacLaughlin DP, Macdonald A (1990). Evidence for the existence of atypical  $\beta$ -adrenoceptors ( $\beta_3$ -adrenoceptors) mediating relaxation in the rat distal colon *in vitro*. *Br J Pharmac*, 101:569-74.
- Mann DMA (1983). The locus coeruleus and its possible role in ageing and degenerative disease of the human central nervous system. *Mech Ageing Devel*, 23:73-94.
- Markowska AL, Stone WS, Ingram DK, Gold PE, Conti LH, Pontecorvo MJ, Wenk GL, Olton DS (1989). Individual differences in aging: behavioral and neurobiological correlates. *Neurobiol Aging*, 10:31-43.
- Martínez Jr JL, Rigter H (1983). Assessment of retention capacities on old rats. *Behav Neural Biol*, 39:181-91.
- May JM, Abel PW, Minnemann KP (1985). Binding of agonists and antagonists to  $\beta$ -adrenoceptors in rat vas deferens: relationship to functional response. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 331:324-33.
- McCormick DA (1989). Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. *Trends Neurosci*, 12:215-21.

- McCormick DA, Prince DA (1988). Noradrenergic modulation of firing pattern in guinea-pig and cat thalamic neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 59:169-94.
- McEntee WJ, Crook TH (1990). Age-associated memory impairment: a role for catecholamines. *Neurology*, 40:526-30.
- McEntee WJ, Crook TH (1991). Serotonin, memory and the aging brain. *Psychopharmac*, 103:143-9.
- McGaugh JL, Gold PE, van Buskirk R, Haycock JW (1975). Modulating influences of hormones and catecholamines on memory storage processes. *Prog Brain Res*, 62:151-62.
- McGrath JC (1978). Adrenergic and "non-adrenergic" components in the contractile response of the vas deferens to a single indirect stimulus. *J Physiol*, 283:23-39.
- McIntosh HH, Westfal TC (1987). Influence of aging on catecholamine levels, accumulation, and release in F-344 rats. *Neurobiol Aging*, 8:233-9.
- McLaughlin M, Ross BM, Milligan G, McCulloch J, Knowler JT (1991). Robustness of G proteins in Alzheimer's disease: an immunoblot study. *J Neurochem*, 57:9-14.
- McMartin LR, Summers RJ (1990). The autoradiographic localization of adenylate cyclase in rat kidney using [<sup>3</sup>H]-forskolin. *Biochem Pharmac*, 39:1019-28.
- McNally W, Roth M, Young R, Bockbrader H, Chang T (1989). Quantitative whole-body autoradiographic determination of tacrine tissue distribution in rats following intravenous and oral dose. *Pharmaceut Res*, 6:924-30.
- McPherson GA, Malta E, Molenaar P, Raper C (1984). The affinity and efficacy of the selective  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulant Ro 363 at  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenoceptor sites. *Br J Pharmac*, 82:897-904.

- Mena EE (1988). THA binding sites in rat brain. *Soc Neurosci Abstr*, 14:208.
- Mesulam MM, Geula C, Moran MA (1987). Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effect of physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles. *Ann Neurol*, 22:683-91.
- Michel MC, Wang XL, Schlicker E, Göthert M, Beckeringh JJ, Brodde O-E (1987). Increased  $\beta_2$ -adrenoceptor density in heart, kidney and lung of spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmac*, 7:41-51.
- Mignery GA, Sudhoff TC, Takei K, De Camilli P (1989). Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature*, 342:192-5.
- Minneman KP (1988).  $\alpha_1$ -Adrenergic subtypes, inositol phosphates and sources of cell  $\text{Ca}^{2+}$ . *Pharmac Rev*, 40, 87-119.
- Minneman KP, Jonhson RD (1984). Characterization of alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptors linked to [<sup>3</sup>H]inositol metabolism in rat cerebral cortex. *J Pharmac Exp Ther*, 230:317-23.
- Misra CH, Shelat HS, Smith RC (1980). Effect of age on adrenergic and dopaminergic receptor binding in rat brain. *Life Sci*, 27:521-6.
- Miyamoto A, Araiso T, Ohshika H (1990). Membrane viscosity correlates with  $\alpha_1$ -adrenergic signal transduction of the aged rat cerebral cortex. *J Neurochem*, 55 (1):70-5.
- Mohr E, Schlegel J, Fabbrini G, Williams J, Mouradian MM, Mann UM, Claus JJ, Fedio P, Chase TN (1989). Clonidine treatment of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 46:376-8.
- Molenaar P, Summers RJ (1987). Characterization of beta<sub>1</sub> and beta<sub>2</sub> adrenoceptors in guinea-pig atrium: functional and receptor binding studies. *J Pharmac Exp Ther*, 241:1041-7.

- Molenaar P, Roberts SJ, Kim YS, Pak HS, Sainz RD, Summers RJ (1992). Localization and characterization of two propranolol resistant (-)[<sup>125</sup>I]cyanopindolol binding sites in rat skeletal muscle. *Eur J Pharmac*, 209:257-62.
- Mollner S, Pfeuffer T (1988). Two different adenylate cyclases in brain distinguished by monoclonal antibodies. *Eur J Biochem*, 171:265-71.
- Molloy DW, Guyatt GH, Wilson DB, Duke R, Ress L, Singer J (1991). Effect of tetrahydroaminoacridine on cognition, function and behaviour in Alzheimer's disease. *Can Med Assoc J*, 144:29-34.
- Monahan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *A Rev Pharmac Toxicol*, 29:365-402.
- Monteverde A, Gnemmi P, Rossi F, Monteverde A, Finali GC (1990). Selegiline in the treatment of mild to moderate Alzheimer-type dementia. *Clin Ther*, 12:315-22.
- Moretti A, Carfagna N, Trunzo F (1987). Effect of aging on monoamines and their metabolites in the rat brain. *Neurochem Res*, 12:1035-9.
- Moroni F, Tanganelli S, Antonelli T, Carla V, Bianchi C, Beani L (1983). Modulation of cortical acetylcholine and gamma-aminobutiric acid release in freely moving guinea pigs: effects of clonidine and other adrenergic drugs. *J Pharmac Exp Ther*, 227:435-40.
- Morrow A, Creese I (1986). Characterization of  $\alpha$  adrenergic subtypes in rat brain: a re-evaluation of [<sup>3</sup>H]WB4101 and [<sup>3</sup>H]prazosin binding. *Mol Pharmacol*, 29:321-30.
- Mouradian MM, Mohr E, Williams AJ, Chase TN (1988). No response to high-dose muscarinic agonist therapy in Alzheimer's disease. *Neurology*, 38:606-8.

- Nahorski SR, Potter BVL (1989). Molecular recognition of inositol polyphosphates by intracellular receptors and metabolic enzymes. *Trends Pharmac Sci*, 10:139-44.
- Neer EJ, Clapham DE (1988). Roles of G-protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*, 333:129-34.
- Newhouse PA, Sunderland T, Tariot PN, Blumhart CL, Weingartner H, Mellow A, Murphy DL (1988). Intravenous nicotine in Alzheimer's disease: a pilot study. *Psychopharmacology*, 98:171-5.
- Newman ME, Salomon H, Lerer B (1986). Electroconvulsive shock and cyclic AMP signal transduction: effects distal to the receptor. *J Neurochem*, 46:1667-9.
- Newman ME, Lipot M, Lerer B (1987). Differential effects of chronic desipramine administration on the cyclic AMP response in rat cortical slices and membranes. *Neuropharmac*, 26:1127-30.
- Newman ME, Lerer B (1989). Post-receptor-mediated increases in adenylate cyclase activity after chronic antidepressant treatment: relationship to receptor desensitization. *Eur J Pharmac*, 162:345-52.
- Neylon CB, Summers RJ (1985). [ $^3\text{H}$ ]Rauwolscine binding to  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the mammalian kidney: apparent receptor heterogeneity between species. *Br J Pharmac*, 85:349-60.
- Nickerson M (1949). The pharmacology of adrenergic blockade. *Pharmac Rev*, 1:27-101.
- Nielsen JA, Mena EE, Williams IH, Nocerini MR, Liston D (1989). Correlation of brain levels of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) with neurochemical and behavioural changes. *Eur J Pharmac*, 173:53-64.

- Nilsson L, Adem A, Hardy J, Winblad B, Nordberg A (1987). Do tetrahydroaminoacridine (THA) and physostigmine restore acetylcholine release in Alzheimer brains via nicotinic receptors? *J Neural Trans*, 70:357-68.
- Nishizuka Y (1984). The role of protein kinase C in cell-surface signal transduction and tumor promotion. *Nature (Lond)*, 308:693-8.
- Nordberg A, Nilsson L, Adem A, Hardy J, Winblad B (1988). Effect of THA on acetylcholine release and cholinergic receptors in Alzheimer brains. En: Giacobini E, Becker R, eds. *Current research in Alzheimer therapy*. Taylor & Francis, New York, 247-57.
- Nordberg A, Nilsson-Hakansson L, Adem A, Lai Z, Winblad B (1989). Multiple actions of THA on cholinergic neurotransmission in Alzheimer brains. *Prog Clin Biol Res*, 317:1169-78.
- Nyback H, Nyman H, Ohman G, Nordgren I, Lindstrom B (1988). Preliminary experiences with THA for the amelioration of symptoms of Alzheimer's disease. En: Giacobini E, Becker R, eds. *Current research in Alzheimer therapy*. Taylor & Francis, New York, 231-6.
- O'Donnell SR, Wanstall JC (1980). Evidence that ICI118,551 is a potent highly  $\beta_2$ -selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize beta-adrenoceptor populations in tissues. *Life Sci*, 27:671-7.
- Ohm TG, Bohl J, Lemmer B (1989). Reduced cAMP-signal transduction in postmortem hippocampus of demented old people. *Prog Clin Biol Res*, 317:501-9.
- Olpe HR, Steimann MW (1982). Aged-related decline in the activity of noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Brain Res*, 251:174-6.
- Osterreider W (1987). 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) is a potent blocker of cardiac potassium channels. *Br J Pharmac*, 92:521-5.

- Palacios JM, Kuhar MJ (1982). Beta adrenergic receptor localization in rat brain by light microscopic autoradiography. *Neurochem Int*, 4:473-90.
- Palacios JM, Hoyer D, Cortes R (1987).  $\alpha_1$ -Adrenoceptors in the mammalian brain: similar pharmacology but different distribution in rodents and primates. *Brain Res*, 419:65-75.
- Park TH, Tachiker KH, Summers WK (1986). Isolation and the flusometric, high performance liquid chromatographic determination of tacrine. *Anal Biochem*, 159:358-62.
- Patocka J, Baigar J, Bielavsky J, Fusek J (1976). Kinetics of inhibition of cholinesterases by 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine *in vitro*. *Coll Czech Chem Commun*, 41:816-24.
- Pazos A, Probst A, Palacios JM (1985).  $\beta$ -Adrenoceptor subtypes in the human brain. Autoradiographic localization. *Brain Res*, 358:324-8.
- Pearce BD, Potter LT (1988). Effect of tetrahydroaminoacridine on M1 y M2 muscarinic receptors. *Neurosci Lett*, 88:281-5.
- Penn RD, Martin EM, Wilson RS, Fox JH, Savoy SM (1988). Intraventricular Bethanechol infusion of Alzheimer's disease: results of double blind and escalating dose trials. *Neurology*, 38:219-22.
- Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE (1977). Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet*, 1:189.
- Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH (1978). Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental est scores in senile dementia. *Br Med J*, 2:1457-9.

- Perry EK, Smith CJ, Court JA, Bonham JR, Rodway M, Atack JR (1988) Interaction of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroaminoacridine (THA) with human cortical nicotinic and muscarinic receptor binding *in vitro*. *Neurosci Lett*, 91:211-6.
- Perry EK, Johnson M, Kerwin JM, Piggott MA, Court JA, Shaw P, Ince PG, Brown A, Perry RH (1992). Converging archicortical cholinergic activities in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 13 (3):393-400.
- Pfeuffer E, Mollner S, Pfeuffer T (1985). Adenylate cyclase from bovine brain cortex: purification and characterization of the catalytic unit. *EMBO J*, 4:3675-9.
- Piccinin GL, Finali G, Piccirilli M (1990). Neuropsychological effects of L-deprenyl in Alzheimer's type dementia. *Clin Neuropharmac*, 13:147-63.
- Pilc A, Enna SJ (1986). Activation of alpha-2 adrenergic receptors augments neurotransmitter-stimulated cyclic AMP accumulation in rat brain cerebral cortical slices. *J Pharmac Exp Ther*, 237:725-30.
- Pitha J, Zjawiony J, Nasrin N, Lefkowitz RJ, Caron MG (1980). Potent beta adrenergic antagonist possessing chemically reactive group. *Life Sci*, 27:1791-8.
- Pontecorvo MJ, Clissold DB, Conti LH (1988). Age-related cognitive impairments as assessed with an automated repeated measures memory task: implications for the possible role of acetylcholine and norepinephrine in memory dysfunction. *Neurobiol Aging*, 9:617-25.
- Potter LT, Ferrendelli CA, Henchett HE, Hollifield MA, Lorenzi MV (1989a). Tetrahydroaminoacridine and other allosteric antagonists of hippocampal M1 muscarine receptors. *Molec Pharmac*, 35:625-60.

- Potter LT, Nitta S, Chaudhry I, Lalezari I, Goldiner P, Foldes FF (1989b). Effects of LF-14, THA and physostigmine in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neurochem Int*, 14:433-8.
- Prado de Carvalho L, Zornetzer SF (1981). The involvement of the locus coeruleus in memory. *Behav Neural Biol*, 31:173-86.
- Procter AW, Wong EHF, Stratmann GC, Lowe SL, Bowen DM (1989). Reduced glycine stimulation of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 53:698-704.
- Rabin RA (1986). Senescence does not alter activation or inhibition of striatal adenylate cyclase. *Neurobiol Aging*, 7:49-51.
- Raff M (1976). Self regulation of membrane receptors. *Nature*, 259:265-6.
- Rainbow TC, Parsons B, Wolfe BB (1984). Quantitative autoradiography of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 81:1585-9.
- Rake AV (1973). Involvement of biogenic amines in memory formation: The central nervous indole amine involvement. *Psychopharmacología*, 29:91-100.
- Rapier C, Lunt GG, Wonnacott S (1988). Stereo selective nicotine-induced release of dopamine from striatal synaptosomes: concentration dependence and repetitive stimulation. *J Neurochem*, 50:1123-30.
- Rees JMH (1966). Anticurare activity of tacrine (THA) *in vitro*. *J Pharm Pharmac*, 18:289-93.
- Reiner PB, McGeer EG (1988). THA increases action potential duration of central histamine neurons *in vitro*. *Eur J Pharmac*, 155:265-70.

- Represa A, Duyckaerts C, Tremblay E, Hauw JJ, Ben-Ari Y (1988). Is senile dementia of the Alzheimer type associated with hippocampal plasticity? *Brain Res*, 452:403-7.
- Reznikoff GA, Manaker S, Rhodes CH, Winokur A, Rainbow TC (1986). Localization and quantification of beta-adrenergic receptors in human brain. *Neurology*, 36(8):1067-73.
- Riekkinen Jr P, Miettinen R, Aaltonen M, Sirviö J, Riekkinen P (1990a). The correlation of passive avoidance deficit in aged rat with the loss of nucleus basalis choline acetyltransferase-positive neurons. *Brain Res Bull*, 25:415-7.
- Riekkinen Jr P, Sirviö J, Pitkänen A, Valjakka A, Riekkinen PJ (1990b). The effects of concurrent manipulations of noradrenergic and cholinergic systems on neocortical EEG and apatial learning. *Behav Neural Biol*, 54: 204-10.
- Robinson SE, Cheney DL, Costa E (1978). Effect of nomifensine and other antidepressant drugs on acetylcholine turnover in various regions of rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac*, 304:263-9.
- Robinson TN, De Souza RJ, Cross AJ, Green AR (1989). The mechanism of tetrahydroaminoacridine-evoked release of endogenous 5-hydroxytryptamine and dopamine from rat brain tissue prisms. *Br J Pharmac*, 98:1127-36.
- Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MMB, Clarke M, Copeland JRM, Dartigues J-F, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ, Jonker C, Lindesay J, Lobo A, Mann AH, Mölsä P, Morgan K, O'Connor DW, da Silva Droux A, Sulkava R, Kay DWK, Amaducci L (1991). Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. *Ann Neurol*, 30:381-90
- Rogawski MH (1987). Tetrahydroaminoacridine blocks voltage-dependent ion channels in hippocampal neurons. *Eur J Pharmac*, 142:169-72.

- Roger KJ, Slater P (1971). Effects of tremorine, physostigmine and tremor blocking drugs on brain monoamines. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 193: 68-72.
- Rogers J, Bloom FE (1985). Neurotransmitter metabolism and function in the aging central nervous system. En: Finch CE, Schneider EL, eds. *Handbook of the biology of aging*. Van Nostrand Reinhold Co, New York, 645-91.
- Rose S (1989). Neuronal mechanisms of learning and memory: challenges and promises. *Neurosci Res Comm*, 4 (3):125-8.
- Roth GS (1984). Altered mechanism of hormonal neurotransmitter action during aging: receptor and post receptor events. En: Cristafalo V, Roberts J, eds. *Altered endocrine status during aging*. Alan R Liss, New York, 71-80.
- Roufogalis BD, Quist EE (1972). Relative binding sites of pharmacologically active ligands on bovine erythrocyte acetylcholinesterase. *Molec Pharmac*, 8:41-9.
- Rowell PP, Winkler DL (1984). Nicotinic stimulation of [<sup>3</sup>H]acetylcholine release from mouse cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem*, 55:2105-10.
- Ruffolo RR, Sulpizio AC, Nichols AJ, De Marinis RM, Heible JP (1987). Pharmacologic differentiation between pre- and postjunctional  $\alpha_2$ -adrenoceptors by SK&F 104078. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac*, 336:415-8.
- Ruthrich HL, Wetzel W, Matthies H (1982). Acquisition and retention of different learning tasks in old rats. *Behav Neural Biol*, 35:139-46.
- Sahakian B, Jones G, Levy R, Gray J, Warburton D (1989). The effects of nicotine on attention, information processing and short-term memory in patients with dementia of Alzheimer type. *Br J Psychiatr*, 154:797-800.

- Sahgal A, Keith AB, Lloyd S, Kerwin JM, Perry EK, Edwardson JA (1990). Memory following cholinergic (NBM) and noradrenergic (DNAB) lesions made singly or in combination: potentiation of disruption by scopolamine. *Pharmac Biochem Behav*, 37:597-605.
- Saper CB (1987). Function of the locus coeruleus. *Trends Neurosci*, 10:343-4.
- Sara SJ (1989). Noradrenergic-cholinergic interaction: its possible role in memory dysfunction associated with senile dementia. *Arch Gerontol, Suppl* 1:99-108.
- Sarter M, Bruno JP, Dudchenko P (1990). Activating the damaged basal forebrain cholinergic system: tonic stimulation versus signal amplification. *Psychopharmacology*, 101:1-17.
- Scarpace PJ, Abrass IB (1986). Beta-adrenergic agonist-mediated desensitization in senescent rats. *Mech Ageing Dev*, 35:255-64.
- Scarpace PJ, Abrass IB (1988). Alpha- and beta-adrenergic receptor function in the brain during senescence. *Neurobiol Aging*, 9:53-8.
- Schauf CL, Sathey A (1987). Tetrahydroaminoacridine blocks potassium channels and inhibits sodium inactivation in *myxicola*. *J Pharmac Exp Ther*, 243:609-13.
- Schauf CL, Sattin AB (1987). Tetrahydroaminoacridine blocks potassium channels and inhibits sodium inactivation in *Myxicola*. *J Pharmac Exp Ther*, 243:609-13.
- Schmidt MJ, Thronberry JF (1978). Cyclic AMP and cyclic GMP accumulation *in vitro* in brain regions of young, old and aged rats. *Brain Res*, 139:169-77.
- Schneider JS, Kovelowski CJ (1990). Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. *Brain Res*, 519:122-8.

- Schultz J, Daly JW (1973). Adenosine 3',5' monophosphate in guinea pig cerebral cortical slices: effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agents, histamine, serotonin and adenosine. *J Neurochem*, 21:573-9.
- Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Fremeau RT, Yang-Feng T, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem*, 265:8181-9.
- Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 78:3303-67.
- Seamon KB, Vaillancourt R, Edwards M, Daly JW (1984). Binding of [ $^3$ H]-forskolin to rat brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 81:5081-5.
- Selden NRW, Cole B, Everitt BJ, Robbins TW (1990). Damage to ceruleo-cortical noradrenergic projections impairs locally cued but enhances spatially cued water maze acquisition. *Behav Brain Res*, 39:29-51.
- Sharma PL (1970). Mechanism of antitremorine of adrenergic beta-receptor antagonists in the rat. *Q J Exp Physiol*, 55:202-6.
- Shaw FH, Bentley GA (1949). Pharmacology of morphine, with special reference to its antagonism by 9-aminoacridine and other chemically related compounds. *Med J Aust*, II:868-74.
- Shaw FH, Bentley GA (1952). Morphine antagonism. *Nature*, 169:712-3.
- Shaw FH, Bentley GA (1953). The pharmacology of some new anticholinesterases. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 31:573-6.
- Shaw FH, Shulman A (1955). Morphine antagonists. *Nature*, 175:388-9.

- Sherman KA, Messamore E (1988). Blood cholinesterase inhibition as a guide to the efficacy of putative therapies for Alzheimer's dementia: comparison of tacrine and physostigmine. En: Giacobini E, Becker R, eds. Current research in Alzheimer therapy. Taylor & Francis, New York, 73-86.
- Sherman KA, Messamore E (1989). Cholinesterase inhibitor therapy for Alzheimer dementia: what do animal models tell us? *Prog Clin Biol Res*, 317:1209-22.
- Sibley DR, Lefkowitz RJ (1985). Molecular mechanism of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature*, 317:124-9.
- Silver A (1975). The biology of cholinesterase. Elsevier, New York.
- Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CCT, Neary D, Thomas DJ, Davison AN (1983). Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J Neurochem*, 40:503-9.
- Sirviö J, Riekkinen Jr P, Valjakka A, Jolkkonen J, Riekkinen PJ (1991). The effects of noradrenergic neurotoxin, DSP-4, on the performance of young and aged rats in spatial navigation task. *Brain Res*, 563:297-302.
- Small GW (1992). Tacrine for treating Alzheimer's disease. *JAMA*, 268 (18):2564-5.
- Smith CJ, Perry EK, Fairbairn AF, Birdsall NJM (1987). Guanine nucleotide modulation of muscarinic cholinergic receptor binding in postmortem human brain-a preliminary study in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 82:227-32.
- Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G<sub>q</sub>. *Science*, 251:804-7.

- Sneddon P, Westfall DP, Colby J, Fedan JS (1984). A pharmacological investigation of the biphasic nature of the contractile response of rabbit and rat vas deferens to field stimulation. *Life Sci*, 35:1903-12.
- Starke K, Docherty JR (1980). Recent developments in  $\alpha$ -adrenoceptor research. *J Cardiovasc Pharmac*, 2:S269-86.
- Steinberg GM, Mednick ML, Maddox J, Rice R, Cramer J (1975). A hydrophobic binding site in acetylcholinesterase. *J Med Chem*, 18:1056-61.
- Stern Y, Sano M, Mayeux R (1988). Long-term administration of oral physostigmine in Alzheimer's disease. *Neurology*, 38:1837-41.
- Stevens DR, Cotman CW (1987). Excitatory actions of tetrahydro-9-aminoacridine (THA) on hippocampal pyramidal neurons. *Neurosci Lett*, 79:301-5.
- Stokes CE, Hawthorn JN (1987). Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer's-diseased brains. *J Neurochem*, 48:1018-21.
- Stone V, Moon W, Shaw FH (1961). Treatment of intractable pain with morphine and THA. *Br Med J*, 1:471-3.
- Strader CD, Pickel VM, Joh TH, Strohsacker MW, Shorr RGL, Lefkowitz RL, Caron MG (1983). Antibodies to the beta-adrenergic receptor: Attenuation of catecholamine-sensitive adenylate cyclase and demonstration of post-synaptic receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 80:1840-4.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983). Release of calcium from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5 triphosphate. *Nature (Lond)*, 306:67-9.

- Strosberg AD (1991). Biotechnology of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Mol Neurobiol*, 4:211-50.
- Su Y, Harden TK, Perkins JP (1980). Catecholamine specific desensitization of adenylate cyclase: evidence for a multi-step process. *J Biol Chem*, 255:7410-9.
- Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, Tachiki K, Kling A (1986). Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *New Engl J Med*, 315:1241-5.
- Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, Tachiki K, Kling A (1988). Tacrine, back to the future? En: Giacobini E, Becker R, eds. *Current research in Alzheimer therapy*. Taylor & Francis, New York, 259-65.
- Summers WK, Tachiki K, Kling A (1989). Tacrine in the treatment of Alzheimer's disease. A clinical update and recent pharmacologic studies. *Eur Neurol*, 29 (Supl).28-32.
- Supattapone S, Worlwy PF, Baraban JM, Snyder SH (1988). Solubilization, purification and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 263:1530-4.
- Tachiki KH, Spidell K, Samuels L, Ritzmann RF, Steinberg A, Lloyd RL, Summers WK, Kling A (1988). Tacrine: levels and effects on biogenic amines and their metabolites in specific areas of the rat brain. En: Giacobini E, Becker R, eds. *Current research in Alzheimer therapy*. Taylor & Francis, New York, 217-21.
- Tariot PN, Cohen RM, Welkowitz JA, Sunderland T, Newhouse PA, Mueller EA, Murphy DL, Weingartner H (1988). Multiple-dose arecoline infusions in Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiat*, 45:901-5.
- Thal LJ, Lasker BR, Masur DM, Blau AD, Knapp S (1988). Physostigmine treatment in SDAT: type of administration, dose and duration. En: Giacobini E, Becker R, eds. *Current research in Alzheimer therapy*. Taylor & Francis, New York, 103-11.

- Thal LJ, Masur DM, Blau AD, Fuld PA, Klauber MR (1989). Chronic oral physostigmine without lecithin improves memory in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc*, 37:42-8.
- Tota MR, Candelore MR, Dixon RAF, Strader CD (1991). Biophysical and genetic analysis of the ligand-binding site of the  $\beta$ -adrenoceptor. *Trend Pharmac Sci*, 12:4-6.
- Tovey KC, Oldham KG, Whelan JAM (1974). A single direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive binding technique. *Clin Chim Acta*, 56:221.
- Troster AI, Beatty WW, Staton RD, Rorabaugh AG (1989). Effects of scopolamine on anterograde and remote memory in humans. *Psychobiology*, 17:12-8.
- Tucek S, Dolezal V (1991). Negative effects of tacrine (tetrahydroaminoacridine) and methoxytacrine on the metabolism of acetylcholine in brain slices incubated under conditions stimulating neurotransmitter release. *J Neurochem*, 56:1216-21.
- U'Prichard DC, Bechtel WD, Rouot BM, Snyder SH (1979). Multiple apparent alpha-noradrenergic receptor binding sites in rat brain: effect of 6-hydroxydopamine. *Molec Pharmac*, 16:47-60.
- Valjakka A, Sirviö J, Pitkänen A, Riekkinen P (1990). Cortical monoamines and EEG activity in young and aged rats. *J Comp Biochem Physiol*, 96:299-304.
- Van Duijn C, Hofman A (1991). Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. *Br Med J*, 302:1491-4.
- Van Luijtelaar MGPA; Tonnaer JADM, Steinbush HWM (1992). Aging of the serotonergic system in the rat forebrain: an immunocytochemical and neurochemical study. *Neurobiol Aging*, 13:201-15.

- Van Rossum JM (1963). Cumulative dose-response curves II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. *Arch Int Pharmacodyn*, 143:299-330.
- Vanscheeuwijck P, Van de Velde E, Fraeyman N (1990). The  $\beta$ -adrenergic transduction system in kidneys from young and senescent rats. *Eur J Pharmac (Mol Pharmac Sect)*, 188:129-37.
- Vanscheeuwijck P, Van de Velde E, Fraeyman N (1989). Effect of aging on properties and function of  $\beta$ -adrenoceptor in rat lung. *Eur J Pharmac (Mol Pharmac Sect)*, 172:373-80.
- Vetulani J, Stawarz RJ, Dingell JV, Sulser F (1976). A possible common mechanism of action of antidepressant treatments. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac*, 293:109-14.
- Vizi ES (1980). Modulation of cortical release of acetylcholine by noradrenaline released from nerves arising from the rat locus coeruleus. *Neuroscience*, 5:2139-44.
- Vohra MM (1979). Evidence for the presence of  $\beta_2$ -inhibitory adrenoceptors in the rat vas deferens. *Gen Pharmac*, 10 (3):221-5.
- Warren DA, Castro CA, Watkins LR, Fleshner M, Woodmansee WW, Maies SF (1989). Attention to nonspatial vs. spatial cues following dorsal noradrenergic bundle (DNAB) lesions. *Soc Neurosci Abstr*, 15, Part 1:610.
- Weiss B (1988). Modulation of adrenergic receptors during aging. *Neurobiol Aging*, 9:61-2.
- Weiss B, Greenberg LH, Cantor E (1980). Denervation supersensitivity and beta-adrenergic receptors as a function of age. In: Pepeu G, Kuhar M, Enna SJ; eds. *Receptors for neurotransmitters and peptide hormones*. Raven Press, New York,

- Weiss B, Greenberg LH, Clark MB (1984). Physiological and pharmacological modulation of the beta-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase system: supersensitivity and unsensitivity. En: Hanin J, ed. *Dynamics of Neurotransmitter function*. Raven Press, New York, 319-30.
- Wenk G, Hughey D, Boundy V, Kim A (1987). Neurotransmitters and memory: role of cholinergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Behav Neurosci*, 101:325-32.
- Wesnes K, Anand R, Lorscheid T (1990). Potential of moclobemide to improve cerebral insufficiency identified using a scopolamine model of aging and dementia. *Acta Psychiatr Scand, Suppl* 360:71-2.
- Wesnes K, Jones RW, Kirby J (1991a). The effects of D-cycloserine, a glycine agonist, in a model of the cognitive deficits associated with ageing and dementia. *Br J Clin Pharmac*, 31:577P-8P.
- Wesnes K, Jones RW, Kirby J, Curtis L (1991b). D-Cycloserine antagonizes scopolamine induced memory impairment and improves memory in the elderly. *Biol Psychiatry*, 29:7005.
- Whishaw IQ (1985). Cholinergic receptor blockade in the rat impairs local but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool. *Behav Neurosci*, 99:979-1005.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 125:1237-9.
- Whittingham TS, Lust WD, Christakis DA, Passonneau JV (1984). Metabolic stability of hippocampal slice preparations during prolonged incubation. *J Neurochem*, 43:689-96.
- Wilson C, Wilson S, Piercy V, Sennitt MV, Arch JRS (1984). The rat lipolytic  $\beta$ -adrenoceptor: studies using novel  $\beta$ -adrenoceptor agonists. *Eur J Pharmac*, 100:309-19.

- Wilson RS, Martin EM (1988). New intrathecal drugs in Alzheimer's disease and psychometric testing. *Ann NY Acad SCI*, 531:180-6.
- Woo JTC, Gaff GA, Fennessy MR (1968). Effects of 2,4-diamino-5-phenylthiazole and 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine on morphine metabolism. *J Pharm Pharmac*, 20:763-7.
- Wu CS, Yang JT (1989). Tacrine protection of acetylcholinesterase from inactivation by di-isopropylfluorophosphate: a circular dichroism study. *Molec Pharmac*, 35:85-92.
- Yabuuchi Y (1977). The  $\beta$ -adrenoceptor stimulant properties of OBC-2009 on guinea-pig isolated trachea, right atrial and left atrial preparations. *Br J Pharmac*, 61:513-21.
- Yamamoto D, Yeh JZ (1984). Kinetics of 9-aminoacridine block of single sodium channels. *J Gen Physiol*, 84:361-77.
- Young LT, Kish SJ, Li PP, Warsh JJ (1988). Decreased [ $^3$ H]inositol 1,4,5-triphosphate binding in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 94:198-202.
- Zaborsky L, Luines VN, Cullinan WE, Allen DL, Heimer L (1993). Catecholaminergic-cholinergic interaction in the basal forebrain: morphological and biochemical studies. *Neuroscience*,
- Zhou LW, Weiss JS, Freilich JS, Greenberg LH (1984). Impaired recovery of alpha<sub>1</sub>-alpha<sub>2</sub>-adrenergic receptors in brain tissue of aged rats. *J Gerontol*, 39:538-46.
- Zhu SG, McGreer EG, Singh EA, McGreer PL (1988). THA potentiates quinolinate NMDA receptor mediated toxicity. *Neurosci Lett*, 95:252-6.
- Zornetzer SF (1985). Catecholamine system involved in age-related memory dysfunction. *Ann NY Acad Sci*, 444:242-54.

- Zornetzer SF (1986). The noradrenergic locus coeruleus and senescent memory dysfunction. En: Crook T, Bartus RT, Ferris SH, Gershon S, eds. Treatment development strategies of Alzheimer's disease. Mark Powley Associates, Connecticut, 337-59.
- Zornetzer SF, Thompson R, Rogers J (1982). Rapid forgetting in aged rats. *Behav Neural Biol*, 36:49-60.
- Zubenko GS, Moossy J, Martínez J, Kopp U, Hanin I (1989). A brain regional analysis of morphologic and cholinergic abnormalities in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 46:634-8.
- Zubenko GS, Moossy J, Kopp U (1990). Neurochemical correlates of major depression in primary dementia. *Arch Neurol*, 47:209-214.