

# Disminución de la función serotoninérgica en córtex temporal de pacientes con enfermedad de Alzheimer y demencia vascular\*

P. Rosel<sup>1</sup>, B. Arranz<sup>2</sup>, M. Urretavizcaya<sup>3</sup>, L San<sup>2</sup>, M.A. Navarro<sup>1</sup>

## Resumen

Se determinó el sistema de recaptación presináptico de serotonina, marcado con [3H]imipramina y [3H]paroxetina, los receptores postsinápticos de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>4</sub>, sus respectivos segundos mensajeros intracelulares, el inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>) y el adenosinmonofosfato cíclico (AMPc), y las concentraciones de serotonina, en neuronas del córtex temporal pertenecientes a 19 pacientes con Enfermedad de Alzheimer, 11 pacientes afectados de Demencia Vascular y 26 controles.

Se observó una disminución significativa de la serotonina intraneuronal en ambas demencias con respecto a la población de referencia (98,3±44,6 en enfermedad de Alzheimer, 86±54,9 en Demencia Vascular y 266,9±136 nmol/g de tejido en controles; P<0,001). Asimismo, los pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer y de Demencia Vascular presentaron un aumento significativo de los lugares de unión de [3H]imipramina (167±64 en enfermedad de Alzheimer; 195±44 en Demencia Vascular y 142±55 fmol/mg proteína en controles; P=0,04) y de [3H]paroxetina (164±54 en enfermedad de Alzheimer; 151±68 en Demencia Vascular y 100±30 fmol/mg proteína en controles; P=0,005), así como un aumento compensatorio del receptor postsináptico 5-HT<sub>2A</sub> (297±78 en enfermedad de Alzheimer; 337±117 en Demencia Vascular y 223±41 fmol/mg proteína en controles; P<0,001) y de su segundo mensajero IP<sub>3</sub> (3,90±2,4 en enfermedad de Alzheimer; 4,49±4,6 en Demencia Vascular y 1,76±0,95 pmol/g de tejido en controles; P=0,05). No se observó ninguna diferencia entre los grupos estudiados en el receptor 5-HT<sub>4</sub> ni en su segundo mensajero AMPc.

El descenso de la concentración de serotonina fue inversamente proporcional al grado de degeneración cerebral (determinado mediante la escala de Alafuzoff, con puntuaciones entre 1 a 11, correspondiente al número de placas seniles y acúmulos neurofibrilares) (r=-0,42; P=0,001). Asimismo, la capacidad de compensación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> al descenso de la neurotransmisión de serotonina fue inversamente proporcional al grado de degeneración cerebral (r=-0,63; P=0,001). Los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentaron una puntuación de la escala de Alafuzoff significativamente mayor (P<0,001) que los pacientes con Demencia Vascular y que el grupo control. Por otra parte, la capacidad de compensación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> fue superior en los estadios iniciales de la enfermedad (puntuación 4-7) que en los estadios más tardíos (puntuación 7-11).

Los resultados obtenidos sugieren una compleja disfunción del sistema serotoninérgico en los pacientes afectados de demencia, con una franca disminución de la síntesis de la serotonina y alteraciones de sus receptores presinápticos y postsinápticos, que intentan compensar al menos en los primeros estadios de degeneración cerebral, el déficit del neurotransmisor.

**Palabras clave:** Serotonina (5-HT), adenosinmonofosfato cíclico (AMPc), inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), enfermedad de Alzheimer, demencia vascular

## Summary. Decrease in serotonergic activity of temporal cortex in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia

Serotonin reuptake system labeled with [3H]-imipramine and [3H]-paroxetine, postsynaptic serotonin receptors 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>4</sub>, their second messengers 1,4,5-inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and cyclic adenosylmonophosphate (cAMP) and serotonin concentrations, were simultaneously studied in neurons of the temporal cortex from 19 patients with Alzheimer's disease, 11 patients with vascular dementia and 26 controls.

A significant decrease in serotonin concentrations was observed in both Alzheimer and vascular dementia patients with respect to controls (98,3±44,6 in Alzheimer's disease, 86±54,9 in vascular dementia and 266,9±136 nmol/g of tissue in controls; P<0,001). A significant increase in both [3H]-imipramine and [3H]-paroxetine binding sites was noted in both patient groups with respect to controls ([3H]-imipramine: 167±64 in Alzheimer's disease, 195±44 in vascular dementia and 142±55 fmol/mg protein in controls; P=0,04; [3H]-paroxetine: 164±54 in Alzheimer's disease, 151±68 in vascular dementia and 100±30 fmol/mg protein in controls; P=0,005). Both patient groups showed a compensatory increase in the 5-HT<sub>2A</sub> postsynaptic receptor (297±78 in Alzheimer's disease, 337±117 in vascular dementia, and 223±41 fmol/mg protein in controls; P=0,000) as well as in their second messenger IP<sub>3</sub> (3,90±2,4 in Alzheimer's disease, 4,49±4,6 in vascular dementia, and 1,76±0,95 pmol/g of tissue in controls; P=0,05).

The decrease in serotonin levels was inversely proportional to the degree of brain degeneration (according to the Alafuzoff scale, in which scores between 1 to 11 correspond to the number of senile plaques and neurofibrillary tangles) (r=-0,42; P=0,001). Furthermore, the compensatory upregulation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor to the reported decrease in serotonin concentrations was inversely proportional to the degree of brain degeneration (r=-0,63; P=0,001). Patients with Alzheimer's disease showed higher Alafuzoff scale scores (P<0,001) than patients with vascular dementia or the control group. The compensatory upregulation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor was higher at the early stages of disease (scores between 4-7) than later (scores between 7-11).

The results obtained in the present study reflect the complex serotonin system alteration occurring in dementia patients, with a severe diminished synthesis of the neurotransmitter serotonin and an alteration of its presynaptic and postsynaptic receptors.

**Key words:** Serotonin (5-HT), cyclic adenosyl monophosphate (cAMP), Inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>), Alzheimer disease, vascular dementia

<sup>1</sup>Sección de Bioquímica Hormonal y Génica. Hospital de Bellvitge <sup>2</sup>Benito Menni CASM <sup>3</sup>Servicio de Psiquiatría. Hospital de Bellvitge, Barcelona.

\*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Gijón del 9 al 11 de Octubre de 2002.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, y a consecuencia del aumento de la expectativa de vida, la presentación de un deterioro cognitivo o demencia ha tomado tal dimensión que plantea un importante problema tanto desde el punto de vista médico como sociolaboral y económico. Aunque la demencia no es un trastorno exclusivo de la vejez, sí que es más frecuente en estas etapas de la vida.

Las causas más frecuentes de demencia son las producidas por una degeneración multisistémica cerebral, como la enfermedad de Alzheimer (60%), seguido por la Demencia Vascul ar (20%) producida por una isquemia o hemorragia cerebral. En menor proporción pueden ser debidas a otras causas, como la Demencia Fronto-temporal, la demencia con cuerpos de Lewy, o la que aparece por ingesta crónica de fármacos, metabólica o por otras múltiples etiologías (1-2).

La demencia es una enfermedad cerebral de aparición brusca, como la Demencia Vascul ar o insidiosa como la demencia tipo Alzheimer, de carácter crónico y progresivo que conlleva un deterioro cognoscitivo, funcional y conductual. Provoca una alteración de múltiples funciones corticales superiores como la memoria, el pensamiento, la orientación, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje, y la capacidad para realizar tareas habituales. La demencia puede presentar además, síntomas psicóticos, con ideas delirantes, y síntomas afectivos.

La Demencia tipo Alzheimer da lugar a una atrofia cerebral, con una importante disminución del peso del cerebro. Afecta a toda la corteza cerebral, aunque especialmente al córtex parietal y temporal (3) aunque también puede haber una ligera atrofia de los núcleos basales. La Demencia Vascul ar, aunque produce un cuadro clínico semejante a la enfermedad de Alzheimer, se diferencia por su comienzo brusco, con una progresión escalonada y por la presencia de signos y síntomas neurológicos.

Diversos estudios han demostrado alteraciones de varios neurotransmisores en la enfermedad de Alzheimer. El más significativo es el relacionado con el sistema de la acetilcolina, con una gran disminución de las proyecciones colinérgicas así como una disminución de la actividad de la acetilcolintransferasa. Otros neurotransmisores también alterados son el sistema serotoninérgico, el sistema noradrenérgico y el sistema peptidérgico (4-7). Dada, además, la gran frecuencia de aparición de síntomas afectivos, especialmente en los primeros estadios de la aparición de la demencia, y la correlación íntima entre serotonina y los trastornos afectivos en el presente trabajo se han estudiado las posibles alteraciones del sistema serotoninérgico en pacientes con enfermedad de Alzheimer y Demencia Vascul ar. Hasta el momento, las determinaciones de serotonina y su metabolito 5-hidroindolilacetato (5-HIAA) han sido las más frecuentemente estudiadas. Escasos estudios han determinado los receptores serotoninérgicos, y ninguno de ellos ha estudiado de forma simultánea los mecanismos de señal intracelular de estos receptores. Por esta razón, el objetivo de este estudio es:

- 1.- Estudio del lugar de recaptación de serotonina presináptico, marcado con dos ligandos [3H]imipramina y [3H]paroxetina.
- 2.- Estudio de los receptores postsinápticos 5-HT<sub>2A</sub> y 5HT<sub>4</sub>.
- 3.- Estudio de los segundos mensajeros, el Inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), a través del cual actúa el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, y del adenosinmonofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>) que es el mecanismo de señal intracelular del receptor 5-HT<sub>4</sub>.
- 4.- Determinar la concentración de serotonina en el citosol de las neuronas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material

La [3H]imipramina (46,6 Ci/mmol) y la [3H]Ketanserina (63,3 Ci/mmol) fueron suministrada por New England Nuclear, [3H]-GR113808 (83 Ci/mmol) por Amersham. El clorhidrato de mianserina y el BIMU 8 fueron aportados por Organon y la 5-hidroxitriptamina creatin sulfato por Sigma. Los equipos de reactivos de Radioinmunoanálisis de [3H]D-mio-Inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y de Adenosín monofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>) fueron suministrados por Amersham. El estándar y el calibrador de serotonina fue suministrado por BioRad.

### Pacientes con Demencia

Los especímenes de cerebro, pertenecientes a 19 pacientes afectos de enfermedad de Alzheimer (con edades comprendidas entre 70 y 100 años) y 11 pacientes con Demencia Vascul ar (con edades entre 76 y 92 años), fueron recogidos en el Departamento de Geriatria de la Universidad de Linköping (Suecia). Cada uno de los cerebros se colocó en una bandeja de hielo, donde se realizó la disección del córtex temporal (áreas 34, 35 y 38 de Brodmann), introducidas en un vial de plástico y congeladas a -80 °C, hasta el momento del estudio radioreceptor. El diagnóstico clínico se verificó histopatológicamente mediante visualización de placas seniles y acúmulos neurofibrilares. La gravedad de los cambios degenerativos se determinó mediante una escala del 1 al 12, siguiendo los criterios de Alafuzoff (8). Ninguno de los pacientes había efectuado tratamiento antidepresivo o antipsicótico en los últimos 4 meses anteriores a la muerte. El intervalo entre la muerte y la autopsia fue de 22 a 27 horas, tanto para ambos grupos de demencia como para el grupo control. Durante este intervalo, los cuerpos fueron conservados a 4°C.

### Grupo control:

El grupo control estaba formado por 26 individuos, con edades comprendidas entre los 63 y 91 años. La muerte fue en todos los casos por otras causas (infarto de miocardio, accidente de tráfico). Los especímenes fueron recogidos en el Departamento de Geriatria de la Universidad de Linköping (Suecia). Una entrevista a los familiares efectuada por el forense, descartó en este grupo la existencia de enfermedades psiquiátricas o neurológicas y/o la administración de algún fármaco serotoninérgico anteriormente a la muerte. La extracción del córtex temporal se realizó de idéntica manera que en los pacientes con Demencia. La elección de las áreas 34, 35 y 38 del córtex Temporal se realizó por la previa observación de una mayor actividad serotoninérgica con respecto a otras áreas del mismo córtex temporal (9-10).

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético local y por el Comité Nacional del Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS.

### Métodos

#### Determinación de D-mio-Inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y de Adenosín monofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>)

—Extracción con ácido perclórico (para AMP<sub>c</sub> e IP<sub>3</sub>): Aproximadamente 100-120 mg de córtex Temporal fueron homogeneizados en 1 mL de solución amortiguadora (50 mM Tris - HCl, 3 mM KCl, 120 mM NaCl; pH 7,4) conteniendo 0,2 mL de ácido perclórico al 20%. Tras una incubación en baño de hielo durante 20 minutos, las muestras fueron centrifugadas a

2000 g durante 15 minutos a 4°C para la sedimentación proteica. El sobrenadante fue decantado en tubos de plástico, en bandeja de hielo y previamente enfriados, y posteriormente neutralizados a pH entre 7-8 con KOH conteniendo HEPES 60 mM.

El KClO<sub>4</sub> producido como consecuencia de la previa neutralización fue sedimentado por centrifugación a 2000×g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue decantado en tubos de plástico e inmediatamente analizado o mantenido a -80°C hasta su determinación. Todos los pasos de extracción fueron desarrollados a 4°C en baño de hielo.

–Radioinmunoanálisis: El protocolo de análisis se efectuó siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham, TRK 1000 para el IP3 y Amersham, TRK 432 para el AMPc). Las concentraciones de IP3 y AMPc se expresaron en pmol/g de tejido.

#### *Determinación de la concentración de serotonina en los especímenes de cerebro*

Tras obtener entre 100-150 mg de tejido, se utilizó el mismo proceso de extracción ácida que para los segundos mensajeros. La determinación de serotonina se efectuó mediante Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC), mediante columna de intercambio iónico (Bio-Rad), Se empleó como calibrador una concentración conocida de serotonina (0,35 nmol/mL) en el mismo medio que las muestras de cerebro, en presencia de una cantidad fija (50 µL) de estándar interno para todas las muestras. El resultado se expresó en nmol/g de tejido.

#### *Método de radioreceptor para determinación de los parámetros de unión de [3H]imipramina, [3H]paroxetina, (receptor presináptico), [3H]Ketanserina (Receptores 5-HT2A) y [3H]-GR113808 (receptores 5-HT4).*

##### *–Preparación de la membrana neuronal*

Aproximadamente 100 mg de cada una de las regiones estudiadas se homogeneizó 2 veces en 10 mL de Tris-CIH 4°C (50 mM Tris- CIH, 120 mM NaCl, 5 mM KCl; pH = 7,4) mediante un Politrón PT 3000. Tras dos centrifugaciones (48.000×g, 10 minutos a 4°C). El *pellet* de las neuronas se resuspendió en el volumen de Tris-CIH necesario para obtener una concentración proteica de 1-1,5 mg/mL para las regiones corticales y de 0,5-1 mg/mL para las regiones subcorticales.

##### *–Análisis de saturación*

*Receptor de [3H]imipramina:* Se incubaron 100 µL de suspensión de membrana neuronal con 100 µL de [3H]imipramina a seis concentraciones decrecientes (desde 10 nM hasta 0,3 nM). La incubación se realizó durante 90 minutos a 0°C (en baño de hielo y en nevera), siendo el volumen total de incubación de 500 µL. La unión no específica se determinó reemplazando 100 µL de tampón por 100 µL de serotonina a una concentración de 100 µM. Bajo estas condiciones se obtuvo una unión completamente saturada y con un único lugar de unión de alta afinidad (11).

*Receptor de [3H]paroxetina:* Se incubaron 750 µL de suspensión de membrana neuronal (concentración proteica aproximada 0,5 mg/mL) con 750 µL de tampón conteniendo [3H]paroxetina a seis concentraciones decrecientes (desde 0,5 nM hasta 0,015 nM). La incubación se realizó durante 60 minutos a 25°C. La unión específica se calculó como la diferencia entre la unión en presencia o en ausencia de 100 µL de serotonina a una concentración de 100 µM (12).

*Receptor 5-HT2A:* Se incubaron 150 µL de suspensión de membrana neuronal (concentración proteica aproximada de 1 mg/mL para áreas corticales y de 0,5 mg/mL para áreas subcorticales) con 50 µL de [3H]ketanserina a seis concentraciones decrecientes (desde 10 nM hasta 0,3 nM). La incubación se realizó durante tres horas a 25°C. La unión no específica se determinó reemplazando 100 µL de tampón por 100 µL de mianserina a una concentración de 10 µM. Bajo estas condiciones se obtuvo una unión completamente saturada y con un único lugar de unión de alta afinidad (9, 13).

*Receptor 5-HT4:* 100 µL de suspensión de membrana neuronal se incubaron con seis concentraciones crecientes de [3H]GR 113808 (0,01-1,5 nmol/L), en presencia de 300 µL de tampón de incubación (HEPES 10nM), durante 30 min. a 37°C en un volumen final de 0,5 mL. Las uniones no específicas fueron determinadas reemplazando 100 µL de tampón de incubación por 100 µL de BIMU 8 (10 µmol/L). Bajo estas condiciones la unión fue completamente saturada y con un solo sitio de unión de alta afinidad (nM) (14).

##### *–Separación*

Después de la incubación, se añadió 10 mL de tampón Tris-CIH para el análisis de ambos ligandos del receptor de recaptación, y 2 mL de tampón Tris-CIH para el análisis de [3H]ketanserina, y 2 mL de tampón HEPES para el receptor de 5-HT4. Las suspensiones fueron filtradas rápidamente por filtros de fibra de vidrio GF/C, procediéndose al lavado de los filtros con su tampón correspondiente. Cada uno de los filtros fue colocado en tubos de plástico con 10 mL de líquido de centelleo. La radioactividad presente en cada filtro se midió mediante un contador de radiaciones β.

##### *Determinación proteica.*

La determinación proteica de cada muestra del receptor postsináptico 5-HT2A se determinó mediante el método de Lowry modificado (15). Como el Tris-CIH puede dar interferencia de color, muestras que contenían solo tampón fueron usadas como blanco.

##### *Datos analíticos y estadísticos.*

Los datos de unión de los estudios de saturación se analizaron mediante un programa informático de ajuste de curvas por mínimos cuadrados (EBDA, Mc Pherson), y de la gráfica de Scatchard se obtuvieron los valores de los dos parámetros de unión de cada receptor: máxima capacidad de unión (Bmax.) expresada en fmol/mg de proteína, y constante de afinidad (Kd) expresada en nM, Todos los ajustes de curvas se realizaron sobre uniones específicas.

El análisis estadístico se efectuó mediante un ANOVA con la prueba de corrección de Bonferroni, usando como covariables, el peso del cerebro y la puntuación obtenida en la escala de Alafuzoff (número de acúmulos neurofibrilares). El nivel de significación fue establecido para una  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Los pacientes y los controles no presentaron diferencias significativas ni en la edad ni en el período postmortem, (tabla I). Sin embargo, los pacientes con enfermedad de Alzheimer (n=19) (1133 ± 100 g; intervalo 1000-1400 g) y los pacientes con Demencia Vascular (n=11) (1149 ± 56 g; intervalo 1067-1240 g) presentaron una disminución estadísticamente signifi-

**Tabla I.** Características de los pacientes y de los controles

	CONTROLES	ALZHEIMER	VASCULAR	P	F
Edad (años)	81 ± 5,5	82 ± 6,9	82 ± 4,7	P=0,78	F= 0,23
Peso (g)	1246 ± 97	1133 ± 100	1149 ± 56	P<0,001	F=10,4
Postmortem (h)	22,2 ± 11,7	27,5 ± 12,5	26 ± 16,7	P=0,34	F=1,08
Acúmulos neurofibrilares	1,68 ± 1,5	7,5 ± 2,1	1,6 ± 1,6		F=74

Los valores se expresan como media ± DE. Se utilizó la prueba de ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes. La prueba de corrección de Bonferroni nos mostró que ambos tipos de demencias presentaban diferencias significativas con el grupo control, pero no entre ellas.

**Tabla II.** Concentración de serotonina en neuronas del córtex temporal

	Serotonina (nmol/g)	
CONTROLES	266,9 ± 136,8 (26,8)	F=9,24; P<0,001
ALZHEIMER	98,3 ± 44,6 (10,8)	
VASCULAR	86,0 ± 54,9 (18,3)	

La prueba de ANOVA con la corrección post-hoc de Bonferroni y utilizando el peso del cerebro, y la puntuación de la escala de Alafuzoff como covariables, nos demuestra que la concentración de serotonina se encuentra significativamente disminuida en ambas demencias con respecto al grupo control. La concentración de serotonina se expresa como media ± DE, y entre paréntesis la DE de la media.

cativa del peso del cerebro en comparación con el grupo control (n=26) (1246 ± 97 g; intervalo 1100-1430 g; F=10,48; P<0,001).

La presencia de placas seniles y de acúmulos neurofibrilares (tabla I) clasificados según la escala de Alafuzoff del 1 al 12 nos muestra que los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentaban una mayor gravedad en los cambios degenerativos (mayor puntuación), con una puntuación en la escala de 7,5 ± 2,1 (intervalo 2-11), existiendo diferencias estadísticamente significativas tanto con el grupo control (1,6 ± 1,5; intervalo 0-4) como con los pacientes con Demencia Vascular (1,5 ± 1,6; intervalo 0-4; F=74,0; P<0,001). No existieron diferencias significativas en la puntuación obtenida en los pacientes con Demencia Vascular y el grupo control.

Tal como se observa en la tabla II, en ambos tipos de demencias existe una disminución estadísticamente significativa de la concentración de serotonina en el citosol de las neuronas del córtex temporal. Los intervalos encontrados son de

90-708 nmol/g de tejido para el grupo control; de 30-224 nmol/g de tejido para los pacientes con enfermedad de Alzheimer, y de 30-198 nmol/g de tejido para los pacientes con Demencia Vascular. Las medias ± DE, y el grado de significación estadística se muestran en la tabla II.

En la tabla III se puede comprobar un incremento estadísticamente significativo de los lugares de unión para la [3H]imipramina y la [3H]paroxetina en ambos tipos de demencias con respecto al grupo control. Los intervalos observados en el grupo control fueron de 65-238 fmol/mg y de 62-151 fmol/mg para las uniones de [3H]imipramina y de [3H]paroxetina respectivamente. Los pacientes afectados de enfermedad de Alzheimer presentaron un intervalo de 90-291 fmol/mg para la [3H]imipramina, y de 36-261 fmol/mg para la [3H]paroxetina, mientras que los pacientes afectados de Demencia Vascular presentaron un intervalo de 133-271 fmol/mg para la [3H]imipramina y de 37-279 fmol/mg para la [3H]paroxetina. No se observaron diferencias significativas en las constantes de afinidad de ambos lugares de unión entre los tres grupos.

En la tabla IV se observa un aumento significativo del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, tanto en la enfermedad de Alzheimer como en la Demencia Vascular con respecto al grupo control debido a una regulación al alza (*upregulation*) para compensar el déficit de serotonina observado en el presente estudio. No se observaron diferencias significativas entre grupos en el otro receptor postsináptico estudiado, el 5-HT<sub>4</sub>. Tampoco se observaron diferencias significativas en las constantes de afinidad de ambos receptores con respecto al grupo control. Los intervalos encontrados para el receptor 5-HT<sub>2A</sub> y el receptor 5-HT<sub>4</sub> son los siguientes: 127-304 fmol/mg y 16-93 fmol/mg respectivamente en el grupo control; 212-470 fmol/mg y 11-136 fmol/mg respectivamente en el grupo de pacientes con Enfermedad de Alzheimer; y de 181-597 fmol/mg y 21-77 fmol/mg respectivamente en los pacientes con Demencia Vascular.

**Tabla III.** Receptor de recaptación presináptico de serotonina, marcado con los ligandos [3H]imipramina y [3H]paroxetina

	[3H]imipramina		[3H]paroxetina	
	Bmáx (fmol/mg)	Kd (nM)	Bmáx (fmol/mg)	Kd (nM)
CONTROLES	142 ± 55	1,2 ± 0,27	100 ± 30	0,15 ± 0,05
ALZHEIMER	167 ± 64	1,4 ± 0,22	164 ± 54	0,19 ± 0,1
VASCULAR	195 ± 44	1,4 ± 0,37	151 ± 68	0,20 ± 0,08

Bmáx: máxima capacidad de unión; Kd: constante de afinidad

La prueba de ANOVA con la corrección post-hoc de Bonferroni y utilizando el peso del cerebro, y la puntuación de la escala de Alafuzoff como covariables, nos demuestra que los lugares de unión para ambos ligandos están significativamente aumentados en ambas demencias, con respecto al grupo control (F=2,59; P=0,04 para la [3H]imipramina; y F=4,44; P=0,005 para la [3H]paroxetina). No existen diferencias significativas en las constantes de afinidad de ambos ligandos entre ambas demencias.

**Tabla IV.** Receptores postsinápticos de serotonina

	5-HT <sub>2A</sub>		5-HT <sub>4</sub>	
	Bmáx (fmol/mg)	Kd (nM)	Bmáx (fmol/mg)	Kd (nM)
CONTROLES	223 ± 41	0,41 ± 0,14	40,3 ± 16	0,15 ± 0,05
ALZHEIMER	297 ± 78	0,56 ± 0,29	42,2 ± 27,8	0,18 ± 0,06
VASCULAR	337 ± 117	0,44 ± 0,15	35,7 ± 20	0,19 ± 0,04

Bmáx: máxima capacidad de unión; Kd: constante de afinidad

La prueba de ANOVA con la corrección post-hoc de Bonferroni y utilizando el peso del cerebro, y la puntuación de la escala de Alafuzoff como covariables, nos demuestra que los receptores postsinápticos 5HT<sub>2A</sub> están significativamente aumentados en ambas demencias con respecto al grupo control ( $F= 7,2$ ;  $P<0,001$ ). No se encuentran diferencias significativas en la máxima unión del receptor 5-HT<sub>4</sub> ( $F=0,33$ ;  $P=0,71$ ), ni diferencias en las constantes de afinidad de ambos receptores.

**Tabla V.** Concentración de los segundos mensajeros intracelulares Adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) e Inositoltrifosfato (IP3) en el citosol de las neuronas del córtex Temporal.

	IP3 (pmol/g)	AMPc (pmol/g)
CONTROLES	1,76 ± 0,95	56,5 ± 27
ALZHEIMER	3,90 ± 2,4	49,6 ± 17
VASCULAR	4,49 ± 4,6	53,5 ± 27

La prueba de ANOVA con la corrección post-hoc de Bonferroni y utilizando el peso del cerebro, y la puntuación de la escala de Alafuzoff como covariables, nos demuestra que el IP3 aumenta de forma significativa en ambos tipos de demencia ( $F=2,52$ ;  $P=0,05$ ), corroborando el aumento de su receptor presináptico 5-HT<sub>2A</sub>. No se encuentran diferencias significativas en las concentraciones de AMPc ( $F=0,64$ ;  $P=0,63$ ), como tampoco de su receptor 5-HT<sub>4</sub>.

Los resultados de los segundos mensajeros estudiados, el IP3 y el AMPc, se muestran en la tabla V. Únicamente el IP3, mecanismo de acción intracelular del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, aumentó de forma significativa en ambos tipos de demencias con respecto al grupo control. Los intervalos encontrados para estos segundos mensajeros son de 0,62-3,5 pmol/g para el IP3 y de 21,9-135 pmol/g para el AMPc en el grupo control; de 0,69-10,7 y de 23,6-100 pmol/g respectivamente en los pacientes con Enfermedad de Alzheimer y de 1,2-17 y de 14,2-96 pmol/g respectivamente en los pacientes con Demencia Vascular.

En los pacientes con enfermedad de Alzheimer se observó una correlación significativa y negativa entre la máxima unión de los receptores postsinápticos 5-HT<sub>2A</sub> y el grado de degeneración cerebral representado por la puntuación de la escala de Alafuzoff ( $r= -0,63$ ;  $P= 0,001$ ), no existiendo correlación significativa en los pacientes con Demencia Vascular ( $r= -0,41$ ;  $P=0,15$ ) o en el grupo control ( $r= 0,24$ ;  $P=0,31$ ). Asimismo, existe una correlación negativa y significativa entre la concentración de serotonina de los tres grupos y la puntuación obtenida en la escala de degeneración cerebral ( $r= -0,42$ ;  $P=0,001$ ).

## DISCUSIÓN

La presencia de numerosas placas seniles y acúmulos neurofibrilares en la corteza cerebral, especialmente en el córtex temporal, y en algunas estructuras límbicas se considera determinante de la enfermedad de Alzheimer, aunque también pueden encontrarse en cantidades inferiores en otras demencias como la Demencia Vascular o en la propia demencia senil. En la enfermedad de Alzheimer existe además una gran pérdida neu-

ronal y atrofia cerebral (4), con la consiguiente disminución en la síntesis de numerosos neurotransmisores.

Diversos estudios han demostrado una disminución de las concentraciones de serotonina en pacientes con enfermedad de Alzheimer y Demencia Vascular en comparación con un grupo control. Carlsson y Gottfries (16) observaron disminuciones significativas en núcleo caudado y putamen de pacientes con Demencia Vascular, sin existir diferencias significativas en las regiones corticales. Otros autores (17) han encontrado hallazgos similares, con disminuciones significativas en hipocampo y parahipocampo y no en córtex temporal. En un estudio posterior de Gottfries y colaboradores (18) tampoco observaron disminuciones significativas en el córtex cerebral (temporal, parietal y parahipocampo), pero si en núcleos basales como hipotálamo y núcleo caudado. Con respecto a pacientes con enfermedad de Alzheimer, también se han encontrado disminuciones en las concentraciones de serotonina (19,20), sin embargo, en un estudio en el que no se observó una disminución de la serotonina cortical, sus autores justificaron este hallazgo por el hecho de que sus pacientes no tomaban medicación psiquiátrica (21). En el presente trabajo se demuestra la existencia de una disminución significativa de la concentración de serotonina en el córtex temporal de pacientes con ambos tipos de demencias y sin tratamiento psiquiátrico anterior a la muerte. Además se observa una correlación negativa y significativa entre la concentración de serotonina y el grado de degeneración cerebral según la puntuación de la escala de Alafuzoff (8). Este hallazgo indica que a mayor cantidad de placas seniles y acúmulos neurofibrilares, existe una mayor degeneración neuronal y una menor posibilidad de sintetizar serotonina. Resultados semejantes a los obtenidos en el presente trabajo han sido publicados en estudios previos (22), en los que se demostró una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones de los metabolitos 5-hidroindolilacetato (5-HIAA) y 4-hidroxi-3-metoxifenilacetato (HVA) en líquido cefalorraquídeo (LCR) y la gravedad de la demencia, de forma que a mayor gravedad, existe una menor concentración de ambos metabolitos.

En el presente estudio se observa un aumento significativo de los lugares de unión del sistema de recaptación presináptica de serotonina marcados con [3H]imipramina y [3H]paroxetina en ambos tipos de demencias. Este hallazgo sugiere que el déficit de secreción de serotonina posiblemente conlleve un descenso compensatorio de la recaptación de la misma en la hendidura sináptica, quedando un mayor número de lugares libres en el complejo de recaptación, y aumentando de esta forma la máxima unión (Bmáx) de los radioligandos utilizados en el presente estudio. Existe un escaso número de estudios publicados sobre

el estado de estos lugares de unión en cerebro de pacientes con demencia. Nuestros resultados coinciden con un trabajo realizado en plaquetas de pacientes con enfermedad de Alzheimer (23) en el que también se observa un aumento de los receptores de [3H]imipramina en estos pacientes. Otros trabajos efectuados en membrana de plaqueta, no muestran diferencias significativas entre pacientes con enfermedad de Alzheimer y el grupo control (24-26). Con respecto a los lugares de unión de [3H]paroxetina, en un estudio efectuado en córtex frontal, córtex temporal y núcleo caudado de pacientes con Demencia Vasculosa no se encontraron diferencias significativas (27).

El receptor postsináptico de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, marcado con [3H]ketanserina o [3H]LSD, ha sido estudiado en ambos tipos de demencia por diversos autores. Sin embargo, los resultados publicados hasta el momento han sido algo contradictorios. Es importante tener en cuenta, cuando se comparan los diferentes estudios, el tratamiento con fármacos antipsicóticos o antidepressivos que han recibido los pacientes durante los meses previos a su muerte, ya que el efecto antagonista de los antipsicóticos y la regulación al alza de estos receptores que producen los antidepressivos pueden interferir en la interpretación de los resultados. Asimismo hay que tener en cuenta la metodología empleada, el ligando utilizado, las regiones cerebrales estudiadas, así como el hemisferio cerebral elegido (10). En un estudio efectuado en córtex frontal y temporal de pacientes con Demencia Vasculosa no se encontraron diferencias significativas en la B<sub>max</sub> ni en la afinidad de este receptor con respecto al grupo control (27). Estos resultados discrepan con los obtenidos en el presente estudio, consistentes en un aumento significativo del número de receptores 5-HT<sub>2A</sub> en córtex temporal de pacientes tanto con Demencia Vasculosa como con enfermedad de Alzheimer, posiblemente debido al aumento compensatorio del receptor postsináptico al déficit de la neurotransmisión de serotonina. Hay que resaltar que ninguno de los pacientes incluidos en el presente trabajo estaba en tratamiento con fármacos antipsicóticos o antidepressivos en los 6 meses previos a su muerte. Con respecto a la enfermedad de Alzheimer, disminuciones del receptor 5-HT<sub>2A</sub> han sido descritos en córtex parietal, sin cambios significativos en córtex temporal y frontal de 11 pacientes con enfermedad de Alzheimer, con únicamente 2 de ellos libres de medicación (28). Asimismo, otros autores (29,30) han observado disminución del número de estos receptores en córtex temporal y parietal. A nivel periférico no se han observado diferencias significativas del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en pacientes con Demencia Vasculosa (32), ni en pacientes con enfermedad de Alzheimer y con Demencia Vasculosa respecto a un grupo control (32).

Los escasos estudios efectuados sobre los mecanismos de señal intracelular indican hasta el momento una disminución del 50-70% de los receptores de IP<sub>3</sub> en córtex parietal de 10 pacientes con enfermedad de Alzheimer, sin cambios significativos en córtex frontal, occipital, temporal, núcleo caudado o amígdala (33), sugiriendo que el aumento compensatorio de las concentraciones de IP<sub>3</sub> secundario al incremento del número de receptores 5-HT<sub>2A</sub> observado en el presente estudio podría ocasionar una disminución de los receptores de este segundo mensajero.

Los resultados obtenidos sugieren una compleja disfunción del sistema serotoninérgico que conlleva desde una disminución inicial de la síntesis de la serotonina, a posteriores compensaciones de sus receptores presinápticos y postsinápticos, en un intento, al menos en los primeros estadios de degenera-

ción cerebral, de compensar el déficit del neurotransmisor. La deservación del sistema serotoninérgico presente en los pacientes con enfermedad de Alzheimer se encuentra íntimamente relacionada con los cambios cognoscitivos y no cognoscitivos del comportamiento que presentan estos pacientes. Es bien conocida la relación existente entre la alteración del sistema serotoninérgico y la agresividad, la sintomatología afectiva, la sintomatología psicótica y las alteraciones del sueño que con frecuencia presentan estos pacientes. La administración de los nuevos antipsicóticos con acción dual sobre el sistema dopaminérgico y serotoninérgico ha demostrado su eficacia en el tratamiento sintomático de los pacientes con demencia (34-36).

Correspondencia:  
Dra Pilar Rosel  
Sección de Bioquímica Hormonal y  
Génica  
Servicio de Bioquímica Clínica  
Hospital de Bellvitge. CSUB  
Feixa Llarga s/n.  
Hospitalet de Llobregat. Barcelona

## BIBLIOGRAFÍA

- Lazarus LW, Newton N, Cohler B. Frequency and presentation of depressive symptoms in patients with primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 1987; 144: 41-45.
- Mervyn Whitford G. Alzheimer's disease and serotonin: a review. *Neuropsychobiology* 1986; 15: 1-10.
- Wilcock GK. The temporal lobe in dementia of Alzheimer's type. *Gerontology* 1983; 29: 320-324.
- Cross AJ, Crow TJ, Peters TJ. Cortical neurochemistry in Alzheimer-type dementia. *Prog in Brain Res* 1986; 70: 153-169.
- Wenk G, Hughey D, Boundy V, Kim A, Walker L, Olton D. Neurotransmitters and memory: role of cholinergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Behav Neurosci* 1987; 101: 325-332.
- Gsell W, Strein I, Riederer P. The neurochemistry of Alzheimer type, vascular type and mixed type dementias compared. *J Neural Transm* 1996; 47: 73-101.
- Sunderland T, Molchan SE, Little JT, Bahro M, Putnam KT, Weingartner H. Pharmacologic challenges in Alzheimer disease and normal controls: cognitive modeling in humans. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1997; 11(4): 23-26.
- Alafuzoff I, Iqbal K, Friden H, Adolfsson R, Winblad B. Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis. *Acta Neuropathol* (1987) 74: 209-225.
- Rosel P, Arranz B, Oros M, Vallejo J, San L, Marcusson J, et al. Different regional distribution of the 5-HT reuptake complex, the 5-HT<sub>2A</sub> receptors and their second messengers IP<sub>3</sub> in human brain. *Neurosci Res Commun* 1999; 2: 107-115.
- Rosel P, Arranz B, Urretavizcaya M, Oros M, San L, Vallejo J, et al. Different distribution of pre and postsynaptic serotonergic receptors in Brodmann areas and brain hemispheres. *Psychiatry Res* (2002); 111(2-3):105-115.
- Rosel P, Vallejo J, Oros M, Serrallonga J, Menchon JM, Navarro M. Changes in platelet [3H]imipramine binding: influences of protein concentration of varying proportions of cytosol or intact platelets and displacing agents used. *Biol Psychiatry* 1995; 38: 464-470.
- Arranz B, Marcusson J. [3H]paroxetine and [3H]citalopram as markers of the human brain 5-HT uptake site: a comparison study. *J Neural Transm* 1994; 97: 27-40.
- Rosel P, Arranz B, San L, Urretavizcaya M, Marcusson J, Navarro M.A. 5-HT<sub>2A</sub> receptors and their second messenger IP<sub>3</sub> are only correlated in human brain and in platelets. *Neurosci Res Commun* 1999; 25: 129-138.
- Arranz B, Rosel P, San L, Sarro S, Navarro M, Marcusson J. Characterization of the 5-HT<sub>4</sub> binding site in human brain. *J Neural Transm* 1998; 105: 575-586.
- Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978; 87: 203-225.
- Carlsson A, Gottfries CG. Neurotransmitter abnormalities in old age dementias. *Proc of the South-East Eur Neuropsychiatry Conference* 1983; 934-645.

17. Wallin A, Alafuzoff I, Carlsson A, Eckernäs SA, Gottfries CG, Karlsson I, et al. Neurotransmitter deficits in a non-multi-infarct category of vascular dementia. *Acta Neurol Scand* 1989; 397-406.
18. Gottfries CG, Alafuzoff I, Carlsson A, Eckernäs SA, Karlsson I, Orelund L, et al. Neurochemical changes in brains from patients with vascular dementia. In Hartmann A, Kuschinsky W, Hoyer S (eds): *Cerebral Ischemia and Dementia*. Berlin, Springer, 1991. Hansson G, Alafuzoff I, Winblad B, Marcusson J. Intact brain serotonin system in Vascular Dementia. *Dementia* 1996; 196-200.
19. Whitford GM. Alzheimer's Disease and serotonin: a review. *Neuropsychobiology* 1986; (3-4) 1-10.
20. Blennow K, Wallin A, Gottfries CG, Lekman A, Karlsson I, Skoog I, et al. Significance of decreased lumbar CSF levels of HVA and 5-HIAA in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1991; 13:107-113.
21. Chen CPLH, Alder JT, Bowen DM. Presynaptic serotonergic markers in community-acquired cases of Alzheimer's disease: correlation with depression and neuroleptic medication. *J Neurochem* 1996; 66: 1592-1598.
22. Gottfries CG, Gottfries I, Roos BE. Homovanilic acid and 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid related to rated mental and motor impairment in senile and presenile dementia. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 1970; 46: 99-105.
23. Bonuccelli U, Piccini P, Marazziti D, Cassano GB, Muratorio A. Increased platelet 3H-Imipramine binding and monoamine oxidase B activity in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1990; 2(2): 139-147.
24. Weizman R, Dick J, Mosek A, Tyano S, Rehavi M. Unaltered platelet [3H]imipramine binding in dementia of the Alzheimer type. *Neuropsychobiology* 1988; 19(2): 69-72.
25. Nemeroff CB, Knight DL, Krishnan RR, Slotkin TA, Bissette G, Mellville ML, et al. Marked reduction in the number of platelet-tritiated imipramine binding sites in geriatric depression. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 45(10): 919-923.
26. Galzin AM, Davous P, Roudier M, Lamour Y, Poirier MF, Langer SZ. Platelet [3H]imipramine binding is not modified in Alzheimer's disease. *Psychiatry Res* 1989; 28(3):289-294.
27. Hansson G, Alafuzoff I, Winblad B, Marcusson J. Intact brain serotonin system in vascular dementia. *Dementia* 1996; 196-200.
28. Procter AW, Middlemiss DN, Bowen DM: Selective loss of serotonin recognition sites in the parietal cortex in Alzheimer's disease. *Intern of Geriatric Psychiatry* 1988; 3:37-44.
29. Cheng AV, Ferrier IN, Morris CM, Jabeen S, Sahgal A, McKeith IG, et al. Cortical serotonin-52 binding in Lewy body dementia, Alzheimer's and Parkinson's diseases 1991; 106 (1): 50-55.
30. Procter AW, Qurne M, Francis PT. Neurochemical features of frontotemporal dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; 1:80-84.
31. Thomas DR, Jones E, Warner N, Harris B, Williams P, Bentley P. Peripheral serotonergic receptor sensitivity in senile dementia of Alzheimer type. *Biol Psychiatry* 1998; 23(2): 136-140.
32. Spigset O, Wilhelmsson C, Mjorndal T, Eriksson S. Serotonin 5-HT2A receptor binding in platelets from patients with Alzheimer's disease or vascular dementia. *Int Psychogeriatrics* 2000; 12(4): 537-545
33. Ebstein RP. Decreased brain [3H]inositol 1,4,5-trisphosphate binding in Alzheimer's Disease. *Neurosci Lett* 1988; 94: 198-2002
34. Palmer AM, Dekosky ST. Monoamine neurons in aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm [Gen Sect]* 1993; 13: 3944-3945.
35. Whitford GM. Alzheimer's disease and serotonin: a review. *Neuropsychology* 1986; 15:133-142.
36. Mintzer JE. Underlying mechanisms of psychosis and aggression in patients with Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 2001; 62 (21):23-25.