

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



Ciencias Biomédicas

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

DISTRIBUCION ANATOMICA DE LA SINTASA DEL
OXIDO NITRICO DURANTE EL DESARROLLO DEL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL AXOLOTL,
Ambystoma mexicanum. Y EL EFECTO DE LOS
INHIBIDORES DE LA SINTASA SOBRE ESTE
PROCESO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

M. EN C. EDUARDO SANCHEZ ISLAS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARTHA LEON OLEA

MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Los resultados obtenidos en este estudio se presentaron en los siguientes congresos y reuniones:

Sánchez-Islas, E. and León-Olea, M. Histochemical Localization Of Nitric Oxide In Olfactory Mucosae Of Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. 28Th Annual Meeting Society For Neuroscience 1998. Los Angeles, CA, VOL. 24, PART 2. NOVEMBER 7-12, 1998.

Sánchez-Islas, E. y León-Olea, M. Localización Histoquímica E Inmunohistoquímica De La Sintetasa Del Óxido Nítrico, En La Mucosa Olfatoria Del Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. XIV Reunión De Investigación Del Instituto Mexicano De Psiquiatría. 1999.

Sánchez-Islas, E. y León-Olea. Distribución De La NADPH-d Y La NOSn En El Epitelio Olfatorio Del Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. XLII Congreso Nacional De La Sociedad Mexicana De Ciencias Fisiológicas, Universidad Autónoma De Zacatecas. ZAC. 26 AL 30 de Septiembre de 1999.

Sánchez-Islas, E., Anton B., and León-Olea, M. Anatomical Distribution Of The Nitric Oxide Synthase And NADPH-d In The Development Of The CNS Of The Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. 29Th Annual Meeting Society For Neuroscience 1999. Miami Beach, FLA, VOL. 25, PART 1. Octubre 23-28, 1999.

Sánchez-Islas E, Mucio-Ramírez S. and León-Olea M. Nitric Oxide Synthase And NADPH-d In The Development Of The CNS Of The Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. XLIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Cancún Quintana Roo, Sep. 3-7, 2000.

Sánchez-Islas E, Mucio-Ramírez S. and León-Olea M. Distribución De La Sintetasa Del Óxido Nítrico Y De La NADPH-Diaforasa En El Desarrollo Del SNC Del Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. XVI Reunión de Investigación del Inst. Nac. De Psiquiatría. Septiembre, 2001.

Sánchez-Islas E Y León Olea Martha. Efecto De La Inhibición Postnatal Del Óxido Nítrico Sobre Las Sinapsinas En El Cerebro De La Rata. XVII Reunión Anual De Investigación, 28-30 De Octubre Del 2002. México, DF.

Sánchez-Islas Eduardo and León-Olea Martha. Effect Of Postnatal Inhibition Of Nitric Oxide On Synapsin I Expression In Rat Brain. Sixth IBRO World Congresses, 10-15 July 2003.

Sánchez-Islas Eduardo and León-Olea Martha. Phyological Effect Of Postnatal Inhibition Of Nitric Oxide On Synapsine I Expression In Rat Brain. 33nd Annual Meeting Society for Neuroscience 2003, November 2-7, 2003.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: SANCHEZ ISLAS EDUARDO

FECHA: 11 OCT. 2004

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado y comité tutorial por sus comentarios y sugerencias:

Dra. Martha Maria De La Salud León Olea

Dr. Francisco Pellicer Graham

Dr. Horacio Merchant Larios

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Dra. Rosalva Esther Talavera Cuevas

Dra. Verónica Guarner Lans

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con mucho cariño a mis padres, hermanos, cuñado(a)s y sobrino(a)s.

A mi grupo de compañeros y amigos de trabajo del Instituto Nacional de Psiquiatría.

A mis amigos que no se dedican a la ciencia y que les causa extrañeza mi actividad.

A mi querida amiga la Dra. Esther Talavera Cuevas por habernos puesto en el camino del NO.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de La Fuente Muñiz, por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Y una muy especial dedicatoria a mi querida tutora, asesora, amiga, la **Dra. Martha León Olea** por todo su apoyo y compromiso para este estudio.

INDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	6
Antecedentes Históricos.....	6
Generalidades del Óxido Nítrico.....	7
Biosíntesis de NO.....	8
Localización del Óxido Nítrico en Tejido Cerebral.....	11
Histoquímica para la NADPH-d.....	11
Distribución del NO en el sistema nervioso.....	12
Funciones del NO.....	13
Aspectos filogenéticos del NO.....	13
El NO durante el desarrollo.....	15
Óxido nítrico en Anfibios.....	17
Óxido nítrico en el SNC del <i>Ambystoma mexicanum</i>	18

CAPITULO I

Distribución anatómica de la sintasa del óxido nítrico durante el desarrollo del sistema nervioso central del axolotl, *Ambystoma mexicanum*

Planteamiento del Problema.....	19
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos.....	20
Materiales y Métodos.....	20
Ovoposición.....	21
Muestreo.....	21
Procesamiento de las muestras y obtención del tejido cerebral.....	22
Estudio histoquímico.....	23
Técnica histoquímica para la NADPH-d.....	23
Estudio inmunohistoquímico.....	23
Técnica inmunohistoquímica.....	23
Características del anticuerpo nNOS.....	24
Procesamiento.....	24
Resultados.....	24

Histoquímica para la NADPH-d e inmunohistoquímica para nNOS.....	25
Etapas embrionarias.....	25
Días 8-12.....	26
Periodo larval.....	26
Días 14-18.....	27
Días 20-30.....	28
Días 60 días y 10 meses.....	29

CAPITULO II

Estructuras del sistema nervioso periféricos positivas a la NADPH-d y a la nNOS

Neuromastos	58
Epitelio nasal	62
Sistema olfatorio del axolotl.....	63
Distribución de la NADPH-d y la nNOS durante el desarrollo del epitelio nasal.....	64
Objetivo General	67
Objetivos Particulares	67
Materiales y Métodos.....	68
Percusión y obtención del tejido nasal	68
Histoquímica para la NADPH-d e inmunohistoquímica para nNOS.....	68
Axotomía olfatoria.....	69
Resultados.....	69

CAPITULO III

Efecto de la inhibición de la sintetasa del óxido nítrico durante el desarrollo del SNC

Introducción.....	76
Inhibición del NO durante el desarrollo.....	77
Sinapsinas.....	78
Sinapsinas y el NO.....	80

PARTE I

Estudio del efecto de la inhibición de la NOS durante el desarrollo del SNC del axolotl

Planteamiento del Problema	80
Hipótesis.....	81
Objetivo General	81

Objetivos Particulares	81
Materiales y Métodos.....	82
Histoquímica para la NADPH-d.....	82
Inmunohistoquímica para la sinapsina I.....	82
Análisis estadístico.....	83
Resultados	83

PARTE II

Estudio del efecto de la inhibición de la sintetasa del oxido nítrico durante la etapa postnatal temprana del cerebro de la rata

Planteamiento del problema	87
Hipótesis.....	87
Objetivo General	87
Objetivos Específicos.....	88
Materiales y Métodos.....	88
Tratamiento	88
Histoquímica para la NADPH-d e Inmunohistoquímica para la sinapsina I	88
Análisis cuantitativo de la histoquímica para la NADPH-d e inmunohistoquímica para la sinapsina I.....	89
Análisis estadístico.....	89
Resultados.....	89
DISCUSIÓN GENERAL	94
CONCLUSIONES.....	105
Referencias.....	107
Anexos.....	120

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.....	9
Figura 2.....	10
Tabla I.....	12
Tabla II.....	14
Tabla III.....	17
Tabla IV.....	21
Figura 3.....	22
Figura 4.....	25
Figuras 5-10.....	30-40
Tabla V.....	41
Figuras 11-12.....	42-57
Figura 19.....	59
Figura 20.....	60
Tabla VI.....	63
Figura 21.....	64
Figura 22.....	65
Figura 23.....	69
Figura 24.....	71
Figura 25.....	72
Figura 26.....	73
Figura 27.....	73
Figura 28.....	74
Figura 29.....	74
Figura 30.....	75
Tabla VII.....	77
Figura 31.....	79
Tabla VIII.....	82
Figura 32.....	84
Figura 33.....	85
Figura 34.....	86
Figura 35.....	86
Tabla IX.....	90
Figura 36.....	91
Figura 37.....	92
Figura 38.....	93

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un gas altamente reactivo y difusible que actúa como un mensajero intracelular en varios sistemas fisiológicos. Esta molécula juega múltiples funciones en el sistema inmune, cardiovascular y nervioso. En el sistema nervioso central el NO se genera por la enzima sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS). Durante el neurodesarrollo de los vertebrados, la NOS se expresa en etapas tempranas y presenta cambios en el patrón de expresión y distribución neuroanatómica. Además, el NO juega un papel en la morfogénesis, sinaptogénesis y plasticidad sináptica. La administración de inhibidores de la NOS, tales como el N-G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), N-G-nitro-L-arginina (L-NOARG), durante periodos críticos de la maduración del sistema nervioso provoca alteraciones, como por ejemplo, en el establecimiento de las proyecciones axonales y en las proteínas que se expresan en las neuronas maduras. En esta tesis se llevo a cabo un estudio descriptivo del patrón de distribución anatómica espacio temporal de las neuronas productoras de NO durante el desarrollo del SNC del axolotl, *Ambystoma mexicanum* (primer capítulo) y de otras estructuras del SNP positivas, tales como el epitelio nasal y los neuromastos (segundo capítulo). Además se analizaron los efectos de la inhibición de la NOS con sus antagonistas, el L-NAME y el L-NOARG, sobre el desarrollo del SNC del axolotl y sobre la sinaptogénesis en la rata (tercer capítulo). Para el primer estudio, se colectaron embriones y larvas de axolotls, desde la etapa embrionaria 13 (E13 / 56h) hasta la etapa juvenil (10 meses de edad), se procesaron para las técnicas de histoquímica para la NADPH-d y la inmunohistoquímica para la nNOS en cortes coronales y parasagiales. Los resultados mostraron coexistencia de la actividad a la NADPH-d y la inmunorreactividad a la nNOS (IR-nNOS) en los núcleos cerebrales, con excepción del bulbo olfatorio y el núcleo anterior olfatorio. Las primeras neuronas y fibras positivas se observaron en el día 8 (8d) y se localizaron en el núcleo reticular inferior de la parte caudal del rombencéfalo. Posteriormente, la presencia de nuevos núcleos cerebrales con fibras y neuronas positivas fue incrementando conforme al desarrollo del cerebro, o sea en un sentido caudo-rostral. Los neuromastos y las neuronas receptoras olfatorias (NRO) del epitelio nasal fueron positivas desde el octavo día del desarrollo. El epitelio olfatorio del axolotl juvenil y adulto neoténico, mostró una tinción fuerte a la NADPH-d en las NRO de la cámara principal nasal, incluyendo a las del órgano vomeronasal. La IR-nNOS se localizó principalmente en las dendritas de las NRO y en los complejos mucomicrociliares y mucobiliares. Por último se estudió el efecto de los inhibidores de la NOS sobre el desarrollo y la maduración del SNC en un grupo de axolotls y otro de ratas. Los axolotls se trataron del día 8 del desarrollo embrionario al 30 del desarrollo larval con N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 2.5 mM) o N-G-nitro-L-arginina (L-NOARG, 2.5 mM). Durante el

tratamiento se colectaron axolotls, controles y tratados, de 8, 14, 16, 20 y 30 días de desarrollo y se procesaron para las mismas técnicas empleadas anteriormente. Al final del tratamiento (30d) las larvas no mostraron alteraciones macroanatómicas comparadas con los controles. No se observaron cambios en la distribución de la actividad de la NADPH-d e inmunorreactividad a sinapsina I. No obstante tuvieron una disminución de la talla que fue significativa y una mayor mortalidad en las larvas tratadas con L-NAME.

En el grupo de crías de rata tratadas con L-NAME, 60 mg/kg/día, del día postnatal (dP) 3 al 23. Se realizaron las técnicas de histoquímica para la NADPH-d e inmunohistoquímica para la sinapsina I en cortes coronales del cerebro de las crías a los 24 dP. Los resultados mostraron una reducción significativa de la actividad a la NADPH-d y de la inmunorreactividad a la sinapsina I en las áreas estudiadas: corteza prefrontal, hipocampo y tálamo dorsal, de las crías tratadas comparadas con las crías control.

Nuestros resultados mostraron una expresión temprana de la tinción a la NADPH-d e inmunorreactividad a la nNOS en el sistema nervioso central y periférico del axolotl, lo que sugiere la participación del NO en el crecimiento, desarrollo y maduración del sistema nervioso y en procesos fisiológicos tempranos como el nado, la transducción sensorial como la olfatoria en el *A. mexicanum*. La presencia de la marca en las NRO del axolotl adulto neoténico, sugiere que el NO participa en la transducción de la señal olfatoria en el adulto, además de regular el flujo sanguíneo local y la secreción de las glándulas de Bowman. Los resultados de la inhibición de la NOS en el desarrollo del *A. mexicanum* mostraron una aparente susceptibilidad a los inhibidores reflejado en la supervivencia y en el talla de las larvas. Con el procedimiento utilizado para inhibir a la NOS durante el desarrollo del axolotl, no encontramos cambios en la distribución y el número de neuronas nitrérgicas en el cerebro. Por lo que sugerimos que hay larvas susceptibles a la inhibición que mueren y las que sobreviven no se afectan grandemente.

Por último, la inhibición crónica del NO con L-NAME en las ratas tratadas en la etapa postnatal temprana, produjo una reducción en la densidad de las sinapsinas en las regiones cerebrales estudiadas (corteza prefrontal, hipocampo y tálamo). Las alteraciones causadas por la deficiencia de NO y de sinápsinas en esta etapa crítica de maduración en la rata pueden afectar funciones que dependen de la formación de conexiones sinápticas, tales como el aprendizaje y la memoria.

SUMMARY

Nitric oxide is a highly reactive and diffusible gas, which acts as an intracellular messenger in various physiological systems. This molecule plays various functions in the immune, cardiovascular and nervous systems. In the central nervous system it is generated by the enzyme neuronal nitric oxide synthase (nNOS). During the neurodevelopment of vertebrates, nitric oxide synthase (NOS) is expressed in the early stages and presents changes in neuroanatomical expression and distribution patterns. Besides, NO plays a role in morphogenesis, synaptogenesis, and synaptic plasticity. Administration of NOS inhibitors, such as N-G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and N-G-nitro-L-arginine (L-NOARG), during critical maturation periods of the central nervous system originates alterations, for example, in the establishment of neuronal projections and proteins that are expressed in mature neurons. In this thesis a descriptive study on the space-temporal anatomic distribution pattern of NO producing neurons was carried out during the CNS development of the axolotl, *Ambystoma mexicanum* (Chapter 1) and of other SNP positive structures, such as nasal epithelia and neuromasts (Chapter 2). In addition NOS inhibitory effects were analyzed with its antagonists, L-NAME and L-NOARG, on CNS development of axolotl and on synaptogenesis in rat (Chapter 3). For the first study, embryos and larvae of axolotls were collected, these included from embryonic stage 13 (E13/56 h) to juvenile stages (10 months of age), Tissues were processed for NADPH-d histochemistry and nNOS immunohistochemistry techniques in coronal and parasagittal slices. Results showed coexistence of NADPH-d activity and nNOS immunoreactivity (IR-nNOS) in cerebral nuclei with the exception of olfactory bulb and anterior olfactory nucleus. The first positive neurons and fibres were detected on day 8 (8d) and were located in the inferior reticular nucleus in the caudal part of rhombencephalon. Posteriorly, the presence of new cerebral nuclei showing positive neurons and fibres increased in accordance to brain development, that is, in a rostral-caudal sense. Neuromasts and olfactory receptor neurons (NRO) of nasal epithelium were positive from day 8 of development. Olfactory epithelium of juvenile axolotl and neotenic adult exhibited a strong NADPH-d staining in NROs located in nasal main chamber, including those in the vomeronasal organ. IR-nNOS was mainly located in NRO dendrites and in mucociliary and mucobiliary complexes. Finally, the effect of NOS inhibitors on CNS development and maturation was studied in a group of axolotls and one of rats. Axolotls were treated from day 8 of embryonic development to day 30 of larval development with N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 2.5 mM) or N-G-nitro-L-arginine (L-NORG, 2.5 mM). During treatment, control and treated axolotls were chosen on development days 8, 14, 16, 20 and 30 to be processed for the techniques employed previously. At the end of treatment (30d), larvae did not

show any macroanatomical alterations compared to controls. No changes in the distribution to NADPH-d activity and synapsin I immunoreactivity were observed. Nevertheless, a significant diminution in size and a higher mortality rate were encountered in L-NAME treated larvae.

In the rat group, pups were treated with L-NAME, 60 mg/kg/day, from postnatal day (dP) 3 to 23. NADPH-d histochemistry and synapsin I immunohistochemistry techniques were carried out in coronal slices of pup brains at 24dP. Results showed a significant reduction in NADPH-d activity and synapsin I immunoreactivity in the following areas: prefrontal cortex, hippocampus, dorsal thalamus in treated pups compared to control pups.

Our results showed an early expression of NADPH-d staining and nNOS immunoreactivity in the central and peripheral nervous systems of axolotl, suggesting NO participation in growth, development and maturation of these systems, as well as in early physiological processes such as swimming and sensorial transduction, specifically olfactory, in *A.mexicanum*. The presence of a label on NROs of adult neotenic axolotl suggests that NO may participate in the transduction of the adult olfactory signal, as well as regulating local blood flux and secretion of Bowman's glands. The results concerning NOS inhibition effect on the development of *A. mexicanum* showed an apparent susceptibility to inhibitors reflected on larva survival and size. The procedure used to inhibit NOS during axolotl development did not reveal changes in the distribution and number of nitrergic neurons in the brain. Thus, we suggest that there are larvae susceptible to NOS inhibition that die, whereas those that survive are not importantly affected.

Finally, chronic NO inhibition with L-NAME in rats treated in early postnatal stages originated a reduction in synapsin density in the brain regions studied –prefrontal cortex, hippocampus and thalamus. Alterations as a consequence of a deficiency of NO and synapsins during this critical maturation stage in rat may affect functions which depend on the formation of synaptic connections, such as learning and memory.

INTRODUCCIÓN

Esta tesis consta de tres capítulos. El primero se refiere al estudio espacio temporal descriptivo de la distribución anatómica de las neuronas productoras de NO durante el desarrollo del SNC del axolotl, *A. mexicanum* y de otras estructuras como la mucosa olfatoria y los neuromastos. En el segundo capítulo se analizan los efectos de la inhibición de la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS), el NOARG y el NAME, sobre el desarrollo del SNC del axolotl y sobre la sinaptogénesis en la rata.

Antecedentes Históricos

Las primeras evidencias para la identificación y fisiología de óxido nítrico (NO), se llevaron a cabo en investigaciones enfocadas al estudio de los mecanismos, mediante los cuales, los neurotransmisores regulan el tono vascular. Hasta antes de los 80 se pensaba que la relajación producida por las sustancias vasodilatadoras, como la acetilcolina o la bradiquinina, se debía a que estas actuaban directamente en la capa muscular de los vasos sanguíneos. En 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron que esta idea era errónea, ya que al separar el endotelio del vaso sanguíneo, el efecto de relajación producido por las sustancias vasodilatadoras no se observaba. Cuando el endotelio se reconstituía con células endoteliales en cultivo, el efecto relajante se volvía a presentar. Estos experimentos indicaron, que en el endotelio, existe una sustancia que se libera, y por difusión llega hasta la capa muscular de los vasos sanguíneos produciendo la relajación, y por ello se le llamó factor relajante derivado del endotelio (FRDE) (Furchgott, 1984). Este mismo efecto se produce en las venas, las arterias y los vasos, y se presenta en respuesta a la presencia de una variedad de sustancias como los nucleótidos de adenina, la trombina, la sustancia P y el ionóforo de calcio A23187 (Busse y Mulsch, 1990). Sin embargo, algunos fármacos como los nitritos y la nitroglicerina que son los más antiguos vasodilatadores conocidos, ejercen también un efecto relajante en el vaso sanguíneo, pero por un mecanismo independiente del endotelio (Furchgott y Zawadzki 1980). Murad et al. (1978) descubrieron que el efecto producido por estos fármacos, en realidad se debía a uno de sus metabolitos: el NO, cuyas propiedades relajantes eran muy similares a las del FRDE, es decir, ambos compuestos presentaban las mismas características: vasodilatación, incremento en la producción de monofosfato de guanocina cíclico (GMPc), su acción se inhibe por hemoglobina u otras proteínas con el grupo hemo (Fe^{++}), y presenta un tiempo de acción corto (4 a 6 s).

Todas estas similitudes entre el NO y el FRDE, llevaron a sugerir a Furchgott y Zawadzki (1980) que eran una misma sustancia. El grupo de Moncada en 1987, trabajando con células endoteliales en cultivo, determinó que no existía diferencia entre ambos compuestos en cuanto a su actividad biológica, estabilidad y susceptibilidad a inhibidores o potenciadores del efecto relajante, concluyendo entonces que el FRDE era en realidad OXIDO NITRICO (Palmer et al., 1987).

Desde 1977, se conocía que al exponer homogenados de corteza cerebral de ratón en presencia de óxido nítrico exógeno o nitrosaminas, se activaba a la guanilato ciclasa (GC), la enzima que sintetiza al GMPc, y que este efecto se inhibía por hemoglobina (Moncada, 1992). Ese mismo año, Deguchi y col. (1977) reportaron que la fracción soluble de GMP de cerebro anterior de rata contenía una sustancia endógena de peso molecular bajo, que activaba también a la GC y su acción se inhibía por hemoglobina, como sucedía en el sistema vascular con el óxido nítrico. Propusieron entonces que dicha sustancia estaba relacionada con las nitrosaminas (Deguchi, 1977). En 1982, este mismo grupo encontró que el aminoácido L-arginina en células de neuroblastoma era el activador endógeno de la GC (Deguchi y Yoshioka, 1982). Es hasta que Palmer y col. (1988) determinan, en células endoteliales que a partir de la L-arginina se sintetiza el NO y la L-citrulina, y es cuando este hallazgo adquiere mayor importancia. Posteriormente, Knowles y col. (1989), encuentran que la formación de NO en el SNC sigue la misma ruta biosintética.

Generalidades del Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO, monóxido de nitrógeno) es una molécula mensajera producida por células endoteliales, macrófagos, neuronas y otros tejidos (Dawson, 1992; Snyder, 1992). Su descubrimiento como molécula mensajera abrió un nuevo panorama en los procesos de comunicación celular y neuronal en los que esta involucrado debido a que presenta características químicas particulares como son: esta compuesto de nitrógeno y oxígeno (NO), su peso molecular es de 30 g/mol, es un radical libre altamente reactivo y presenta una gran liposolubilidad por lo que puede difundirse libremente a través de las membranas. Posee una vida media del orden de segundos y se sintetiza a demanda. No tiene un sitio de almacenamiento específico en las células y puede funcionar como su receptor el Fe^{++} ó el S- de diversas metaloproteínas a las cuales se une (Marletta, 1989; Moncada et al., 1991; Nathan, 1992; Marletta, 1993).

El NO actúa por lo menos en tres sistemas: en el sistema inmunológico, es el responsable de la destrucción de bacterias y células tumorales; en el sistema circulatorio, induce la relajación

vascular (Furchgott et al., 1984). En el sistema nervioso, se le ha implicado en procesos celulares tales como: liberación de neurotransmisores, citotoxicidad y muerte neuronal (Dawson et al., 1991), regulación del flujo sanguíneo cerebral (Iadecola, 1993), la potenciación a largo plazo en proceso de memoria y aprendizaje y la toxicidad mediada por el receptor NMDA (Dawson y Snyder, 1994). El NO está relacionado con enfermedades neurodegenerativas tales como: el Alzheimer, la Corea de Huntington y el daño cerebral por isquemia hipóxica, donde las neuronas que producen NO tienen una resistencia selectiva a la neurodegeneración asociada con estas enfermedades (Snyder y Bredt, 1992).

Biosíntesis del NO

El NO y su coproducto de reacción, la L-citrulina, se forman durante la oxidación de la guanidina nitrogenada del aminoácido L-arginina, una reacción bioquímica que cataliza la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS) (Palmer et al., 1988). De esta enzima se han caracterizado tres isoformas: la neuronal (bNOS, nNOS, NOS tipo I), la inducible (iNOS, NOS Tipo II), localizada en los macrófagos y en varias otras células de mamíferos y la endotelial (eNOS, cNOS, NOS tipo III) (Lowesteyn y Snyder, 1992; Marletta, 1993; Mayer, 1995). La NOS neuronal y endotelial son producidas constitutivamente y son dependientes de Ca^{++} /Calmodulina, ambas producen cantidades picomolares de NO. La inducible a diferencia de las otras se expresa en bajas concentraciones en condiciones basales y se induce por diferentes estímulos o agentes químicos como las citocinas (γ -interferón) y lipopolisacáridos de bacterias, y no es dependiente de calcio para su actividad (Stuehr y Griffith, 1992). La inducción de la iNOS puede formar grandes cantidades (> 1000 veces) de NO por largos periodos de tiempos comparados con las nNOS o la eNOS (Robbins y Grisham, 1997) (Fig. 1).

El óxido nítrico se produce en el citoplasma de la neurona postsináptica, se difunde a través de la membrana en dirección radial y retrógrada hacia la neurona presináptica, por esta última razón se le denomina *mensajero retrógrado*. Una vez en el citoplasma de la célula presináptica; se une al grupo hemo de la guanilato ciclasa (GC) y activa la síntesis de GMPc, produciendo un incremento en la concentración de este nucleótido (Garthwaite et al., 1988; Gally et al., 1990) (fig. 2). En el sistema nervioso, la nNOS se localiza en neuronas, mientras que la iNOS se encuentra en el tejido glial (Stuehr y Griffith, 1992).

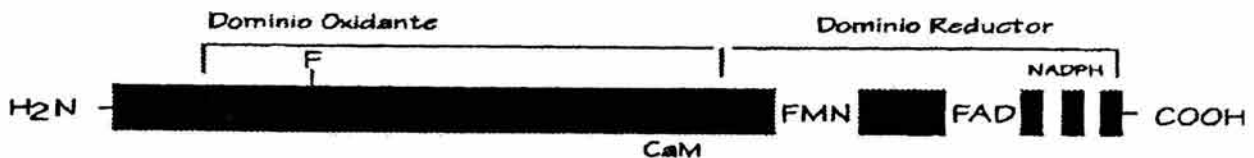
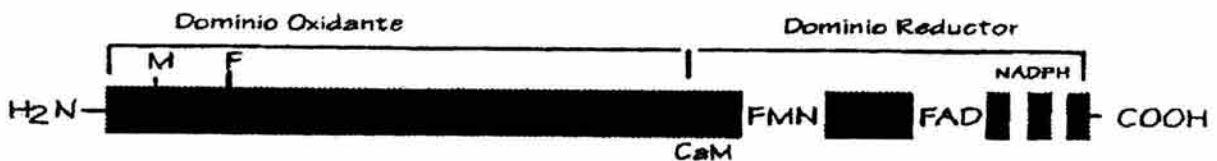
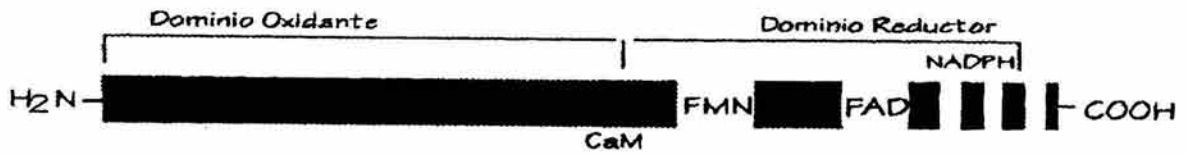


Figura 1. Esquema representativo de la secuencia de aminoácidos de las tres isoformas de la sintasa del óxido nítrico de mamíferos y de la P-450 reductasa. Estas cuatro proteínas tienen varias características en común, su secuencia carboxilo terminal es similar y constituye el dominio reductor, que presenta sitios de unión para FMN y FAD, así como para NADPH. La parte amino terminal contiene el dominio oxigenasa que en la NOS endotelial y neuronal tiene un sitio de fosforilación. Todas las NOS están constituidas por una región de 320 aminoácidos que se piensa que posee los sitios de unión para el grupo hemo, las tetrahydrobiopterinas y la arginina. Los dominios oxigenasa y reductasa están separados por un sitio de unión para el complejo Ca^{++} /Calmodulina. FMN= dinucleótido de flavina, NADPH= nicotin adenin dinucleótido fosfato, CaM= sitio de unión para calmodulina, P= sitio de fosforilación.

Aunque la distribución de las dos enzimas en el sistema nervioso es diferente y necesita distintas señales para ser activadas, ambas requieren para su funcionamiento de los cofactores; nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), tetrahydrobiopterina (TBH4), y flavinas (FAD/FMN) (Bredt y Snyder, 1990; Forsterman et al., 1991; Murphy et al., 1993). El óxido nítrico se libera en grupos neuronales que presentan receptores sinápticos para los aminoácidos excitadores como N-metil-D-aspartato (NMDA) y el kainato (Bredt y Syder, 1989; Garthwaite et al., 1989a,b). Se sabe que al estimular el receptor NMDA se genera una corriente entrante de Ca^{++} que incrementa la concentración de este ion en la terminal postsináptica (MacDemont et al., 1986). El Ca^{++} al unirse a la proteína calmodulina forma un complejo Ca^{++} /Calmodulina que junto con el cofactor BH4 se unen a la nNOS, la cual esta asociada a la proteína de densidad postsináptica (PSD-95) en la membrana neuronal y la mueven hacia el citoplasma

(Christopherson et al., 1999). Ahí es desfosforilada por la calcineurina e inicia, a partir de L-arginina, la producción de NO y de su coproducto L-citrulina. Posteriormente el NO generado intervendrá en diferentes funciones neuronales (Bredt y Snyder, 1990; Moncada, 1992).

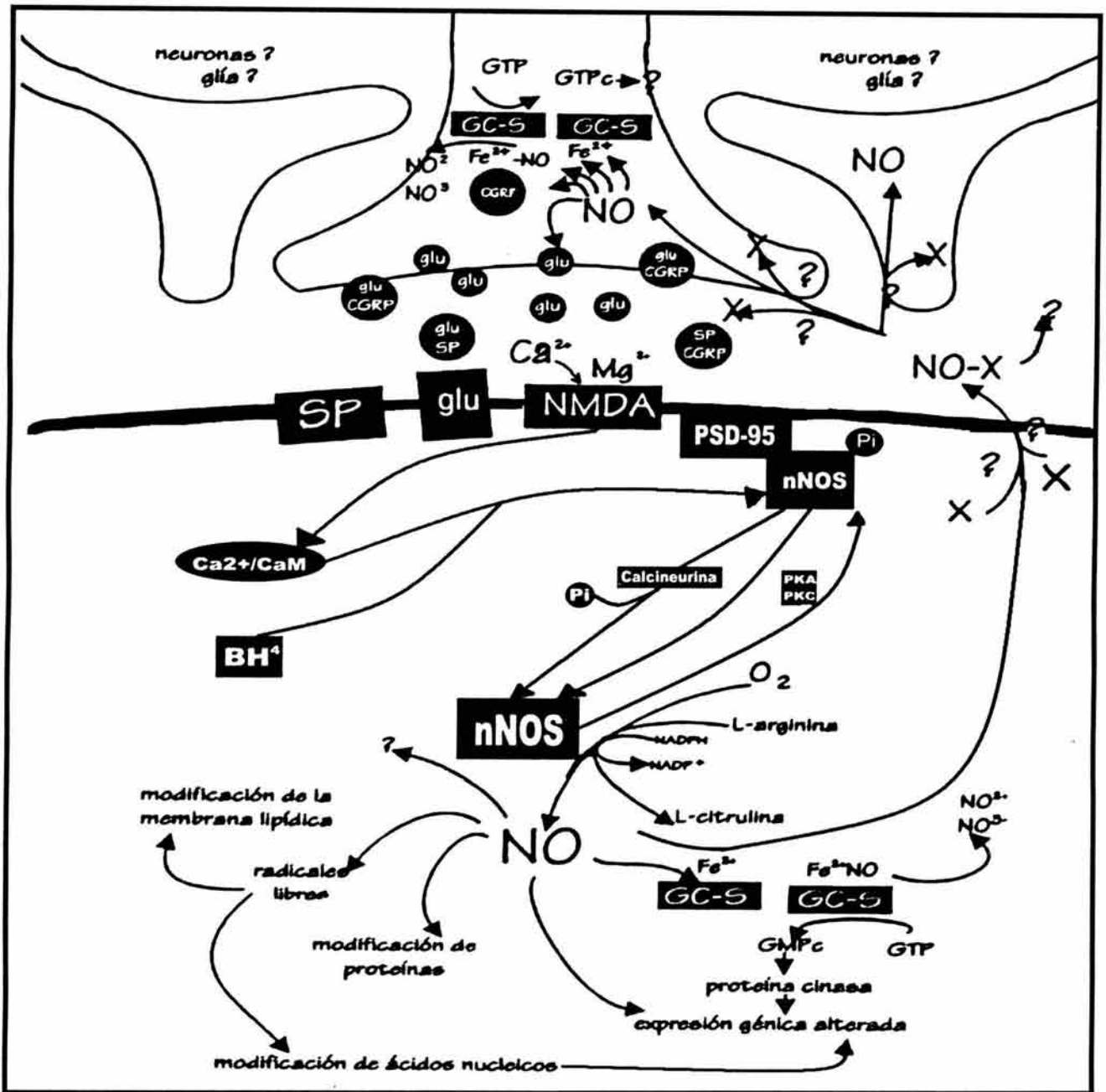


Figura 2. Mecanismo de biosíntesis y acción del óxido nítrico (NO) en las neuronas. Este diagrama muestra la activación de la síntesis del NO por el aminoácido glutámico (glu), así como las diferentes acciones propuestas que puede tener el NO al difundirse a través de la membrana, ya sea en las neuronas presinápticas ó en la neurona donde fue sintetizado. NOS: sintasa del óxido nítrico, GC-S: guanilato ciclasa soluble, tetrahidrobiopterina (BH4). Esquema modificado de Stuehr y Griffith, 1992.

Localización del NO en Tejido Cerebral

Las células que sintetizan NO pueden observarse por medio de técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas. En la técnica inmunohistoquímica se emplean anticuerpos específicos para la localización de los tres tipos de isoenzimas de la NOS (Kishimoto et al., 1993, Herbison et al., 1996). Además se han desarrollado anticuerpos para detectar a la L-arginina y a la citrulina, el precursor y el coproducto de la biosíntesis del NO (Xie et al., 2002).

Histoquímica para la NADPH-d

El método histoquímico se basa en revelar la actividad de la enzima NADPH-diaforasa (NADPH-d). Este método consiste en la incubación del tejido en un medio que contiene una sal soluble de β -NADPH, un aceptor artificial (cromógeno), un detergente para permear el tejido, la enzima oxidativa presente en el tejido que cataliza la transferencia de un electrón de la molécula NADPH a una sal, el azul de nitrotetrazolio. Esta reacción produce un precipitado insoluble de color azul oscuro en las neuronas que producen NO. La actividad llamada NADPH-diaforasa de la enzima produce una tinción en las neuronas que contienen la NOS y es comúnmente usada como un marcador histoquímico para la nNOS. Sin embargo, la técnica histoquímica para la NOS no puede considerarse como totalmente específica, ya que puede marcar a la NOS endotelial en áreas cerebrales donde se ha descrito (Matsumoto et al., 1993; Tracey et al., 1993; Dinerman et al., 1994). Sin embargo, Matsumoto y col. (1993), demostraron que con la fijación con paraformaldehído al 4% durante dos horas se puede asegurar que esta actividad diaforásica pertenece exclusivamente a la nNOS. Diversos estudios demostraron que tanto la NADPH-d como la NOS tienen la misma distribución en el SNC (Dawson et al., 1991). No obstante existen evidencias en varios vertebrados de que su localización no es idéntica en algunas estructuras del SNC y SNP como es el bulbo olfatorio, el núcleo principal olfatorio, la mucosa olfatoria y glándula adrenal. Al respecto se ha sugerido que puede deberse al tipo, tiempo y concentración de fijador (paraformaldehído) utilizado para la perfusión, así como a la diferente sensibilidad que tienen los métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos de la detección de la NOS (Hope et al., 1991; Kidd et al., 1995).

También se utiliza la técnica de hibridación *in situ* con sondas marcadas con radioactividad para el estudio de la distribución del RNA mensajero de la NOS en tejido neuronal (Bredt et al., 1991; Kishimoto et al., 1993). Estas sondas están formadas por secuencias de 40-50 nucleótidos con una región conservada de humano y rata y se usaron en los primeros estudios neuroanatómicos (Dawson et al., 1991). También se emplean riboprobeas radiactivas o no

radiactivas con la mas alta especificidad y afinidad con mejores resultados (Endoh et al., 1994; lwase et al., 1998).

Tabla I. Distribución de la nNOS/NADPH-d en el sistema nervioso central de la rata

ESTRUCTURA			
TELENCEFALO	DIENCEFALO	MESENCEFALO	PUENTE/MEDULA
Corteza cerebral	Hipotálamo	Tegmentum ventral	Núcleos pedunculopuntino
N. endopiriforme ventral	(Sistema perivascular neurosecretor y cuerpos mamilares)	Núcleo interpeduncular	Tegmental laterodorsal
Núcleo claustrum	Tálamo	Núcleo linear rostral del rafe	Tegmental ventral
Bulbo olfatorio accesorio	Eminencia media	Núcleo rafe dorsal	N. pontino reticulo-tegmental
Y principal		Núcleo central gris	Núcleo parabraquial
N. olfatorio posterior		Núcleo peripeduncular	Locus coeruleus
Y anterior		Sustancia nigra parte lateral	Núcleo trigéminol sensorial
Precomisura hipocampal		Núcleo geniculado	Cuerpo trapezoide
Tecta taenia		Colículo inferior y superior	Rafe magnus
Núcleo acumbens		Cerebelo	Núcleo reticular pontino
Estría terminalis			Núcleo supragenua
Putamen caudado			N. hipoglossal prepositus
Tubérculo olfatorio			N. vestibular espinal y medial
Islas de Calleja			Núcleo coclear dorsal
Septum			Campo reticular medular
Globo pálido			Tracto solitario
Sustancia innominata			N. cuneate y gracile
Hipocampo			N. dorsal del nervio vago y oral
Amígdala			N. trigéminol espinal

Distribución del NO en el Sistema Nervioso

El conocimiento de la distribución de las neuronas productoras de óxido nítrico se debe a la implementación de la histoquímica de la NADPH-d en tejido fijado con paraformaldehído que llevo al uso frecuente de este método para estudios neuroanatómicos incluso antes de conocer la naturaleza de la enzima, este método ya se utilizaba (Thomas y Pearse, 1964; Bara, 1979; Scherer-Singler et al., 1983). La demostración de que la tinción histoquímica de la NADPH-d es debida a la actividad de la NOS (Hope et al., 1991) rápidamente permitió hacer posible un análisis detallado anatómico de las neuronas productoras de NO en el sistema nervioso central (Vincent y Hope, 1992; Vincent y Kimura, 1992). La ausencia de la expresión de inmunorreactividad a la NOS y de actividad a la NADPH-d en los ratones que carecen de la nNOS provee evidencias definitivas de la especificidad de este procedimiento histoquímico simple (Huang et al., 1993).

La distribución anatómica de la actividad de la NADPH-d e inmunorreactividad a la NOS se estudiaron primero en el sistema nervioso central de la rata (Vincent y Kimura, 1992; Rodrigo et al., 1994), posteriormente se estudiaron otros vertebrados de la escala filogenética (ver Tabla II).

La mayoría de ellos presentan una distribución neuroanatómica similar. La nNOS tiene una distribución anatómica amplia en el sistema nervioso, por lo que el NO producido por esta enzima participa en diversos procesos fisiológicos del sistema nervioso. En la tabla I se muestra de manera general la distribución de esta enzima en SNC de la rata (Vincent y Kimura, 1992; Rodrigo et al., 1994).

Funciones del NO

El NO en el SNC esta involucrado en un gran numero de funciones como: en la liberación de neurotransmisores (Moncada et al., 1991; Dawson et al, 1994; Garthwaite y Boulton, 1995), en la potenciación a largo plazo durante los procesos de aprendizaje y memoria (Huang, 1997; Myslivecek, 1997; Yamada, 1998; Hawkins et al., 1998; McCabe y Nicol, 1999; Rose, 2000; Das, 2003). El fuerte incremento de la producción de NO está asociada con neurotoxicidad y en otros casos funciona como neuroprotector, dependiendo del estado oxidativo de esta molécula (Crow y Beckman, 1995; Paakkari y Lindsberg, 1995; Rubbo et al., 1996; Minagar et al., 2002; Asanuma, 2003; Contestabile et al., 2003; Jacintho y Kovacic 2003). Participa en los procesos de la nocicepción (Zimmermann M. 2001; Rao, 2002; Yeo, 2002; Buzzi et al., 2003; Monck, 2003), y en funciones neurovasculares (Ziche y Morbidelli, 2000; Hintze, 2001; Vallance y Chan, 2001; Ignarro et al., 2002; Faraci, 2003; Walford y Loscalzo, 2003). En el sistema nervioso periférico, el NO provoca la relajación del músculo liso no vascular y vascular (Moncada et al., 1997; Hirooka y Takeshita, 2000; Hintze, 2001; Ignarro et al., 2002). En el sistema immune, el NO esta involucrado en la patogénesis y control de enfermedades infecciosas, tumores, procesos autoinmunes y enfermedades degenerativas crónicas (Heales, 1997; Parkinson, 1997; Dawson y Dawson, 1998; Bogdan, 2001; Coleman, 2001; Maccioni, 2001; Potenza et al., 2001; Czlonkowska, 2002; Asanuma, 2003; Ischiropoulos H y Beckman, 2003).

Aspectos filogenéticos del NO

El NO fue originalmente identificado en bacterias (Najjar y Allen, 1954; Verhoeven 1956). Posteriormente, se identificó en tejido de mamífero, sin embargo con las técnicas de biología molecular se sabe que el NO es un mensajero neuronal de origen filogenético temprano que se ha conservado a través de la evolución de los vertebrados. La presencia de la NOS se ha demostrado en diferentes especies de invertebrados y vertebrados a lo largo de la escala filogenética: Moluscos (Elofsson et al., 1993; Moroz et al., 1993; Sánchez-Álvarez et al., 1994; Jacklet y Gruhn, 1994; Gelperin, 1994; Serfozo et al., 2002; Taylor et al., 2003), artrópodos

(Elphick et al., 1993; Müller y Buchner, 1993; Davies, 2000; Bicker, 2001a,b), crustáceos (Elphick et al., 1993; Talavera et al., 1995; Hermann y Erxleben, 2001; Erxleben y Hermann, 2001; Scholz, 2002), ciclóstomos (Schober et al., 1994; Zielinski et al., 1996), peces (Schober et al., 1993; Östholm et al., 1994; Bordieri et al., 2003; Singru et al., 2003; Yamamoto et al., 2003), anfibios (Sato, 1990; Li et al., 1992; León-Olea et al., 1994; González et al., 1996; Flores et al., 1996; Muñoz et al., 1996; Sánchez-Islas y León-Olea, 2001; González et al., 2002; Pisu et al., 2002; González et al., 2003), reptiles (Regidor y Ponch, 1988; Brüning et al., 1994; Cao y Eldred, 2001; Moon et al., 2002), aves (Brüning, 1993; Li y Furness, 1994; Atoji et al., 2001; Rickard y Gibbs, 2003) y mamíferos (Mizukawa et al., 1989; Vicent y Kimura, 1992; Egberongbe, 1994; Judas, 1999; Lazarov, 2002) (Tabla II).

Tabla II. Óxido Nítrico en la escala filogenética

Phylum	Sistema	Refs.
Mamíferos		
Humano, rata, ratón	SNC	70, 50, 238, 283, 63, 152
Aves		
Pichón, pollo doméstico	SNC	4, 25
Reptiles		
Tortuga (<i>Pseudemys scripta elegans</i>)	SNC	26
Anfibios		
<i>Xenopus laevis</i>	SNC	28
<i>Rana esculenta</i>	SNC	35
<i>Rana perezi</i>	SNC	208
Axolotl, <i>Ambystoma mexicanum</i>	SNC	164
<i>Pleurodeles waltlii</i>	SNC	199
Peces		
Trucha (<i>Oncorhynchus mickiss</i>)	SN	253
Pez Dorado	SN	27
Agnatos		
Ciclóstomos (<i>Lampetra planeri</i>)	SN	254
Artrópodos		
Mosca (<i>Drosophila melanogaster</i>)	SN	204
Abeja (<i>Apis mellifera</i>)	SN	205
Crustáceos		
Acocil (<i>Cambarellus montezumae</i>)	SN (ganglio)	269
Moluscos		
<i>Helix aspersa</i>	SN (ganglio periesofágico)	245
<i>Helix pomatia</i>	SN (ganglios)	295
<i>Ilyanassa obsoleta</i>	SN (ganglio central)	295
<i>Octopus vulgaris</i>	SN (ganglios)	295
<i>Pleurobranchaea californica</i>	SN (ganglios)	295
Hurudnio		
Sangüijuela	SN (ganglios)	162

El NO Durante el Desarrollo

Los primeros estudios de la distribución anatómica de las neuronas nitrérgicas durante el desarrollo del cerebro se hicieron principalmente en la rata. Estos se realizaron en áreas específicas cerebrales con el uso de la técnica histoquímica para la NADPH-d (Vincent, 2000).

Utilizando la misma técnica, se han hecho estudios para ver el comienzo y las variaciones de las neuronas nitrérgicas durante el desarrollo prenatal y postnatal del cerebro de rata.

En estadios tempranos, las neuronas positivas a la NADPH-d tienen una morfología inmadura, con procesos irregulares y delgadas, las cuales se van haciendo más largas y regulares durante los subsecuentes estadios del desarrollo hasta alcanzar el fenotipo maduro. Así, las características maduras tales como tamaño, número de procesos celulares e intensidad de tinción definen a las células positivas a la NADPH-d en cada una de los estados del desarrollo. El patrón de distribución de la actividad de la NADPH-d como la inmunorreactividad de la NOS son similares en los mismos estados de desarrollo. Los elementos neuronales marcados con la NADPH-d son más evidentes, incluyendo porciones del árbol dendrítico y la longitud de los axones que no se observan claramente con la inmunohistoquímica para la NOS (Vincent, 2000).

Los estudios de la NOS durante el desarrollo sugieren que el NO tienen un papel en la morfogénesis, en la plasticidad y maduración sináptica y en la formación del patrón de conexión del sistema nervioso durante el desarrollo (Gally et al., 1990; Edelman y Gally, 1992; Derer y Derer, 1993; Douglas et al., 1993; Bredt y Snyder, 1994; Giuili et al., 1994; Williams et al., 1994; Wu et al., 1994; Terada et al., 1996; Bertini y Bentivoglio, 1997). En este sentido, la expresión de la NADPH-d en varias regiones cerebrales se correlacionan con el tiempo de innervación. Este es el caso de las fibras musgosas en el cerebelo, y en las conexiones tálamo-cortical (Bredt y Snyder, 1994) y nigro-estriatal (Derer y Derer, 1993). También el patrón espacio temporal de la expresión de NADPH-d observado en las neuronas del tálamo y tectum es durante la innervación de estas regiones (Williams et al., 1994; Bertini y Bentivoglio, 1997). Bredt y Snyder (1994) reportaron la expresión temporal de la NOSn en las neuronas de la placa cortical cerebral en los días embrionarios E15-E19 de la rata. Durante estos días las neuronas presentan una marca intensa, la cual se correlaciona con la extensión de sus prolongaciones a través del cuerpo estriado y el tálamo. Esta marca decae rápidamente y desaparece en el día 15 postnatal. Giuili y col. (1994) utilizaron hibridación *in situ*, para ver la distribución del RNAm de la NOS, en el cerebro del ratón durante el desarrollo embrionario y postnatal. Ellos encontraron que el RNAm de la NOS se expresa a los 19 días de gestación en diferentes capas del neuroepitelio cortical, neuroepitelio colícular, puente y se reduce marcadamente en el estado postnatal temprano, excepto en el bulbo olfatorio accesorio y núcleo pedúnculo pontino. En el estado postnatal hay un incremento del RNAm en el hipocampo y en la capa molecular del cerebelo. Terada y col. (1996) reportaron la distribución de NO entre los días embrionarios 15 (E15) y 19 (E19), estadios

tempranos importantes de neurogénesis y de actividad sináptica. Ellos sugieren que la expresión temporal de la NOSn puede reflejar un papel importante en los procesos de neurogénesis, sinaptogénesis y crecimiento neuronal.

El NO tiene un papel en la formación del patrón sináptico durante el aprendizaje, así como en el establecimiento y refinamiento de proyecciones axonales durante el desarrollo y la regeneración (Gally et al., 1990; Edelman y Gally, 1992; Derer y Derer, 1993; Douglas et al., 1993; Williams et al., 1994; Wu et al., 1994). Estos procesos pueden ser críticos para el desarrollo normal de las proyecciones topográficamente organizadas, tales como las proyecciones retino-colicular y cortico-colicular (Tenório et al., 1996).

En el desarrollo embrionario del sistema olfatorio de la rata, las neuronas receptoras olfatorias expresan nNOS durante su migración y durante el establecimiento de las sinapsis primarias en el bulbo olfatorio. La expresión de la nNOS decae rápidamente después del nacimiento y no se detecta en el día 7 postnatal. Además, la expresión de la NOS es rápidamente inducida en la regeneración de las neuronas receptoras olfatorias después de una bulbectomía y se localiza particularmente en los axones en crecimiento. Así, el NO puede jugar un papel en el establecimiento de proyecciones en el desarrollo y regeneración de las neuronas olfatorias (Roskams et al., 1994).

Recientemente, Peunova y col. (2001) clonaron el gen que codifica a la sintasa del óxido nítrico neuronal del *Xenopus laevis* (NOSx) y reportaron el papel del NO en la morfogénesis del cerebro, particularmente en el tectum de este anfibio. Este grupo determinó el patrón de desarrollo de expresión del gen y lo compararon con el patrón de distribución de la NADPH-d, encontrando que ambos patrones son similares. En este estudio probaron los efectos de la generación e inhibición del NO en el desarrollo del cerebro de los renacuajos de *Xenopus* y encontraron que la generación e inhibición de NO afecta la proliferación celular y el número total de células en el tectum del *Xenopus*. Estos efectos recíprocos de ganancia y pérdida de NO, en la proliferación celular, apoyan un modelo en el cual el NO actúa como un regulador negativo de la proliferación celular en el cerebro intacto de varios vertebrados.

Óxido Nítrico en Anfibios

La actividad de la NADPH-d en los anfibios se ha estudiado en diferentes estructuras, tanto del SNP como del SNC: retina (Sato, 1990; Angotzi et al., 2002), pineal (Sato, 1990), sistema

hipotálamo-hipofisial (Prasada-Rao et al., 1997), oído (Li et al., 1992; Flores y col., 1996), epitelio nasal (Sánchez-Islas y León-Olea, 2001), intestino (Olsson, 2002), tracto gastro-intestinal (Badawy y Reinecke, 2003), bulbo olfatorio (Porteros et al., 1996). La actividad de la NADPH-d en anfibios se ha integrado con amplios estudios de la distribución completa de esta enzima en el cerebro de anfibios urodelos, el axolotl *Ambystoma mexicanum* (León-Olea et al., 1994) y la salamandra *Pleurodeles waltii* (González et al., 1996) y de anuros, *Rana perezi* (Muñoz et al., 1996) y *Xenopus laevis* (Brüning y Mayer, 1996)(Tabla III). En el SNC de estos anfibios se reporta una distribución amplia de la presencia de la NADPH-d. Esto sugiere que el NO participa en diferentes funciones cerebrales similares entre los diferentes anfibios.

Tabla III. Distribución del óxido nítrico en el SNC de anfibios

<i>Ambystoma mexicanum</i> (axolotl, adulto neoténico)	<i>Pleurodeles waltii</i> (salamandra)	<i>Rana perezi</i> (rana)
<p>Telencéfalo Bulbo olfatorio Núcleo accesorio olfatorio Palio dorsal Palio hipocampal Palio piriforme Striatum Amígdala-striatum Núcleo preóptico</p> <p>Diencefalo Eminencia media Habenua Hipotálamo Núcleos talámicos</p> <p>Mesencefalo Tegmentum Tectum Núcleo del trigémino Núcleo ístmico Cerebelo</p> <p>Rombencefalo Núcleo del tracto solitario Núcleo reticular inferior</p> <p>León-Olea et al. (1994)</p>	<p>Telencéfalo Bulbos olfatorios Región pallial Septum Striatum caudal Amígdala Area preóptica</p> <p>Diencefalo Hipotálamo (parte ventral y Tubérculo posterior)</p> <p>Mesencefalo Tectum Tegmentum mesencefálico Región ístmica</p> <p>Rombencefalo Tracto trigémino Tracto solitario Núcleo rafe Formación reticular</p> <p>González et al. (1996)</p>	<p>Telencéfalo Bulbo olfatorio Región pallial Área septal Núcleos de la banda diagonal Striatum Amígdala Área preóptica Receso infundibular del III v</p> <p>Diencefalo Núcleo hipotalámico Supraquiasmático y magnocelular Núcleo talámico</p> <p>Mesencefalo Área pretectal Tectum óptico mesencefálico Torus semicircularis</p> <p>Rombencefalo Área octava Núcleo del rafe Núcleo reticular Núcleo trigémino sensorial Núcleo del tracto solitario Niveles obex Núcleo de la columna dorsal</p> <p>Muñoz et al. (1996)</p>

Óxido Nítrico en el SNC del *Ambystoma mexicanum*

El *Ambystoma mexicanum* es un anfibio que por sus características biológicas particulares resulta ser un modelo idóneo para los estudios ontogenéticos. Una de estas características es que el *A. mexicanum* es un anfibio "neoténico obligado inducible", esto quiere decir que no sufre metamorfosis en condiciones naturales, llega a la madurez sexual y se reproduce, conservando su morfología de larva. La metamorfosis se puede inducir experimentalmente, mediante la

administración de tetrayodotironina (T4) lo que desencadena una serie de eventos metabólicos que producen la transformación. Es ovíparo y los huevos ya fecundados son depositados en el exterior, por lo que se puede seguir su desarrollo embrionario.

En este anfibio hemos realizado estudios inmunohistoquímicos para ver la localización anatómica en el sistema nervioso central y periférico de péptidos como los opioides: leu-, met-enkefalina, beta-endorfina, octapéptido y nociceptina/orfanina FQ (León-Olea et al., 1991, Sánchez-Islas et al., 1994, Mucio-Ramírez et al., 2001; Sánchez-Islas y León-Olea, 2001). La NADPH-d tiene una amplia distribución de neuronas y fibras positivas en el cerebro del axolotl adulto neoténico. Principalmente en el bulbo olfatorio, núcleo anterior olfatorio, comisura, núcleo del palio dorsal, estriado y piriforme, en la zona del la amígdala-estriado, eminencia media, hipotálamo, núcleos talámicos, tectum, núcleo del trigémino, núcleo ístmico, cerebelo, núcleo reticular inferior, núcleo de los tractos solitarios (León-Olea et al., 1994).

CAPITULO I

Distribución Anatómica de la Sintasa del Óxido Nítrico Durante el Desarrollo del Sistema Nervioso Central del Axolotl, *Ambystoma mexicanum*

El propósito de este estudio fue documentar el desarrollo espacio temporal de las neuronas productoras de óxido nítrico durante el desarrollo del SNC del *Ambystoma mexicanum*. Por lo que se propuso realizar un estudio ontogenético de la distribución anatómica del óxido nítrico en el sistema nervioso del *A. mexicanum*, utilizando la técnica histoquímica de la NADPH-d y la inmunohistoquímica para NOS para determinar el inicio y distribución de las neuronas productoras de NO durante el desarrollo.

Planteamiento del Problema

En mamíferos se describió la presencia de neuronas productoras de óxido nítrico en estadios tempranos del desarrollo del SNC. En el *A. mexicanum*, demostramos la existencia y distribución anatómica del NO en el cerebro del adulto neoténico. Dado que se ha sugerido un papel importante del óxido nítrico en el desarrollo y crecimiento del SNC de vertebrados. El interés del primer capítulo fue conocer la distribución espacio temporal del NO durante el desarrollo del SNC del *A. mexicanum*.

Objetivo General

Realizar un estudio de la distribución anatómica del óxido nítrico durante el desarrollo del sistema nervioso central del axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Iniciándose en la etapa de neurulación hasta la etapa juvenil, utilizando la técnica histoquímica de NADPH-d y la inmunohistoquímica para la NOS.

Objetivos Específicos

Conocer en qué etapa se inicia la presencia de neuronas y fibras nitrérgicas así como determinar la morfología de éstas y su localización anatómica por medio de la técnica a la NADPH-d e inmunorreactividad a la nNOS en neuronas y fibras.

Establecer si hay diferencias en la distribución de la NADPH-d y la nNOS en las diferentes etapas del desarrollo embrionario con la del adulto.

Comparar la distribución anatómica y temporal de las neuronas y fibras nitrérgicas durante la ontogenia del *A. mexicanum* con la de otras especies de vertebrados descritos por otros grupos.

Describir la existencia y localización de otras estructuras positivas a la NADPH-d y a la NOSn relacionadas con el SNC, como son: el epitelio nasal y los receptores sensoriales de la línea lateral (neuromastos), durante el desarrollo ontogenético del *A. mexicanum*.

Materiales y Métodos

Los experimentos se hicieron de acuerdo a las guías de cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Psiquiatría RF y del ILAR of National Research Council para el uso de animales experimentales, después de ser aprobados por comité local de bioética del mismo instituto.

Se utilizaron ajolotes de la especie *Ambystoma mexicanum* (axolotl), adultos neoténicos de uno y otro sexo, los cuales se obtuvieron del Lago de Xochimilco en México, D.F. y se mantuvieron en un acuario abierto a una temperatura de 18 a 20 °C, con un ciclo de luz/obscuridad de 10/14h y se alimentaron con peces vivos pequeños y artemia salina. La temporada de reproducción de estos anfibios es en las estaciones de invierno y primavera. Previo a esta temporada se formaron parejas de ajolotes para su reproducción en las condiciones del laboratorio.

Ovoposición

La reproducción natural del axolotl, que es durante el invierno y la primavera, en esta época se utilizaron 10 parejas de axolotls. Se colocaron dos parejas de hembras con machos por pecera hasta su reproducción en condiciones de laboratorio, durante estas dos temporadas. Las peceras se prepararon con filtros con carbón activado para mantener la calidad del agua. Cuando se produjo la ovoposición, los huevos se sacaron de las peceras y se colocaron en una caja de acrílico transparente que contenían 2 l de solución de Steinberg [(NaCl (3.4 g), KCl (0.05 g), CaCl₂ (0.05 g), MgSO₄ · 7 H₂O (0.205 g), y buffer HEPES (1.10 g/1 l de agua destilada)] al 20%

(pH, 7.4), con aireación. A partir de ese momento se observó el desarrollo de los huevos para que en el momento de comenzar la neurulación se hiciera el muestreo.

Muestreo

Para identificar las etapas del desarrollo se utilizaron las tablas de desarrollo descritas por Harrison (1969), Schreckenber y Jacobson (1980), Bordzilovskaya et. al. (1989) para hacer el muestreo desde la neurulación (Estadio 13, que se presenta entre las 55 a 56.30 h después de la primera división), hasta la etapa juvenil (10 meses). El muestreo se realizó de la siguiente manera:

Después de las 56 h de desarrollo (etapa 13 después de la primera división) se colectaron 12 ejemplares, cada 8 h. El tiempo en que se lleva acabo la neurulación es de 16 h. Luego se colectaron 12 ejemplares cada 48, hasta llegar a un 1 mes de edad. Posteriormente se escogieron 12 ejemplares cada 7 días (168 h) hasta que las larvas tuvieran 2 meses de edad y se colectaron 8 larvas a los 3, 6 y 10 meses. Se obtuvo un total de 24 grupos de muestras (Tabla IV, Fig. 3).

El calendario de la toma de muestras se planeó de esta forma porque al comienzo de la neurulación los cambios neuroanatómicos se suceden mas rápidamente, después se alargo el tiempo de muestreo, ya que en estas etapas los cambios no son tan rápidos (Schreckenber y Jacobson, 1980).

Tabla IV. Calendario de la toma de muestras

Grupo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Edad Muestreada	56h	64h	72h	6d	8d	10d	12d	14d	16d	18d	20d	22d	24d	26d	28d	1m	37d	44d	51d	57d	2m	3m	6m	10m
No. de Ejemplares	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	8	8

Procesamiento de las muestras y obtención del tejido cerebral

Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% (PF) durante 6 h. A partir de los seis meses los axolotls se perfundieron de la siguiente manera: los animales se anestesiaron por inmersión en etil p-amino benzoato (benzocaína, Sigma, 0.02%) y se perfundieron a través del cono arterioso con 100 ml de solución salina fría mas heparina (Lab. Pisa, Guadalajara, Jal., México) seguida por 250 ml de solución fijadora de PF en buffer fosfatos salino (PBS, 0.1 M, pH 7.4).

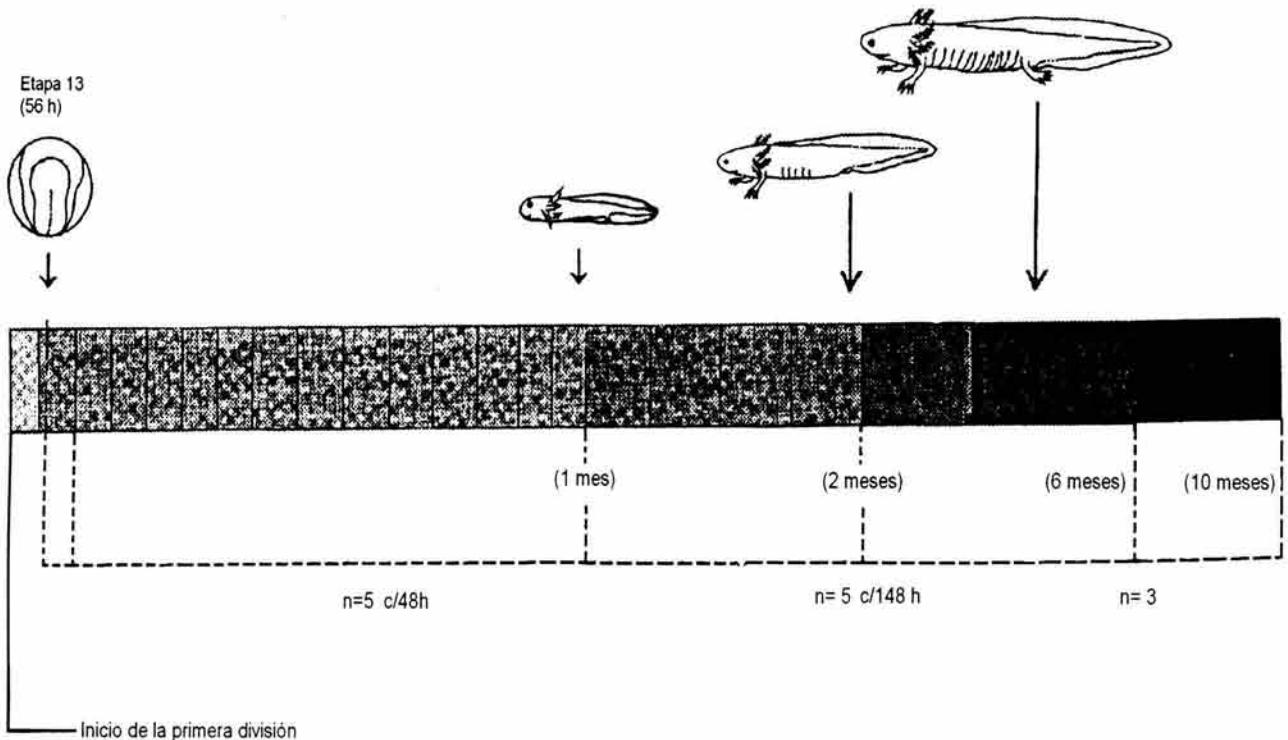


Figura 3. Representación esquemática de la toma de muestras en cada una de las horas y meses escogidos del desarrollo del axolotl, *Ambystoma mexicanum*.

Se extrajo el cerebro y se postfijó por inmersión en la misma solución fijadora (6 h, 4 °C). Tanto las larvas como los cerebros de los axolotls se equilibraron en sacarosa 30% en PBS a 4 °C y se almacenaron hasta ser utilizados. Posteriormente, se cortaron coronal y parasagitalmente (15-25 μm) con un críostato (-18 °C) y se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados. Los cortes se secaron y se almacenaron (4 °C, 24 h).

Estudio histoquímico

La técnica para la NADPH-d se utilizó para el estudio de la existencia y localización anatómica y de las neuronas y fibras nerviosas positivas a esta enzima durante el desarrollo del SNC de *A. mexicanum*.

Técnica histoquímica para la NADPH-d (Vicent y Kimura, 1992). Esta técnica consistió en la incubación de los cortes cerebrales en 10 ml de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.4, 37 °C) en una mezcla con 0.3% de Tritón X-100, 1 mg/ml NADPH, 10 mg/ml de azul de nitrotetrazolio (NBT), durante 1 h y 45 min. Los portaobjetos se lavaron y dejaron secar. Los cortes se hidrataron y algunos se contratiñeron con safranina al 0.01% y se montaron en resina sintética. Las preparaciones se analizaron con el microscopio óptico, y se tomaron fotomicrografías con película para papel EKTAR 25 y para diapositivas Ektar 64 profesional.

Para determinar la especificidad de la tinción de la NADPH-d, en los cortes de cerebro se realizaron los siguientes controles: (1) sin el sustrato de la NADPH o (2) sin el aceptor de electrones el NBT para controlar la posible coloración inespecífica.

Estudio inmunohistoquímico

Con este estudio se analizó la localización y distribución de la nNOS durante el desarrollo del SNC del *A. mexicanum*. Se utilizaron las muestras que se procesaron como se describió anteriormente.

Técnica de inmunohistoquímica o indirecta de inmunofluorescencia (Coons, 1954). Para esto se utilizó un antisuero policlonal para la nNOS, el cual fue donado por el Dr. Emson de la Universidad de Cambridge. Este anticuerpo se empleó en tejido nervioso de rana y lagarto (González et al., 1996; Smeets et al., 1997).

Características del anticuerpo nNOS. El anticuerpo fue hecho en oveja contra el purificado de la NOS neuronal recombinante de rata. Este reconoce a la NOS neuronal en un Western blots, y la inmunorreactividad es abolida por la preadsorción del anticuerpo con la proteína de la NOS neuronal recombinante (1 mM, toda la noche, 4 °C) (Herbinson et al., 1996).

Las preparaciones se analizaron en un fotomicroscopio Leitz Laborlux 12 con iluminación epifluorescente y fotografiados con una película Ektachrome Elite Kodak o con T-max 100 ASA.

Procedimiento. Los cortes cerebrales se secaron (30 min.) y se incubaron con el primer anticuerpo (nNOS) a una concentración de 1:100, en una cámara húmeda (4 °C, 70 h). Después se lavaron tres veces con PBS (15 min). Se incubaron con el segundo anticuerpo fluoresceínado (IGg hecho en conejo contra oveja y conjugado a isotiocianato de fluoresceína, Lab. Jackson) en una dilución de 1:50 a 1:100 en una cámara húmeda (37 °C, 24 h) por último se lavaron tres veces con PBS (15 min) y se montado con en Antifade (medio de montar para fluorescencia, Molecular Prob.).

Se realizaron diferentes controles: a) omisión del primer anticuerpo, b) omisión del segundo anticuerpo, c) control PBS, (el experimento se corrió únicamente con PBS tritón para observar la fluorescencia nativa) y d) control positivo con cortes de cerebro de rata.

El análisis de las preparaciones se realizó en un microscopio Leitz, Laborlux 12 equipado con una lámpara de vapor de mercurio de 50 W y un bloque de filtros especiales para la banda de (490-510 nm) para isotiocianato de fluoresceína. Se tomaron fotomicrografías en color con película Ektachrome 400, y en blanco y negro con película tri-X pan 400 ASA.

Resultados

Los estudios de histoquímica e inmunohistoquímica durante el desarrollo se realizaron para conocer y determinar la existencia y localización del óxido nítrico en los diferentes días del desarrollo del SNC del *Ambystoma mexicanum*.

Para la identificación de las diferentes edades de las larvas se emplearon las tablas de desarrollo del *Ambystoma mexicanum* (Schreckenber y Jacobson, 1975; Bordzilovskaya et al. 1989). La identificación de las estructuras cerebrales se hizo comparativamente con las del adulto en el atlas del *Ambystoma tigrinum* de Herrick, J. (1917), y de otros trabajos neuroanatómicos de dos especies de salamandra: *Pleurodeles waltlii* (González et al., 1995) y *Triturus alpestris* (Naujo-Manteural et al., 1994).

Histoquímica para la NADPH-d e inmunohistoquímica para nNOS

Nuestros resultados mostraron que la actividad a la NADPH-d y la inmunorreactividad a la nNOS tienen una distribución anatómica y celular igual, con excepción del bulbo olfatorio. Por lo que en la descripción de los resultados únicamente se describirá como una sola **marca**. La descripción de la densidad de las fibras se menciona cualitativamente como: escasa, media y alta. En la figura 4 se muestran un caso para cada tipo de densidad, para esto se utilizó la marca de la tinción histoquímica de la NADPH-d, ya que fue la más evidente.

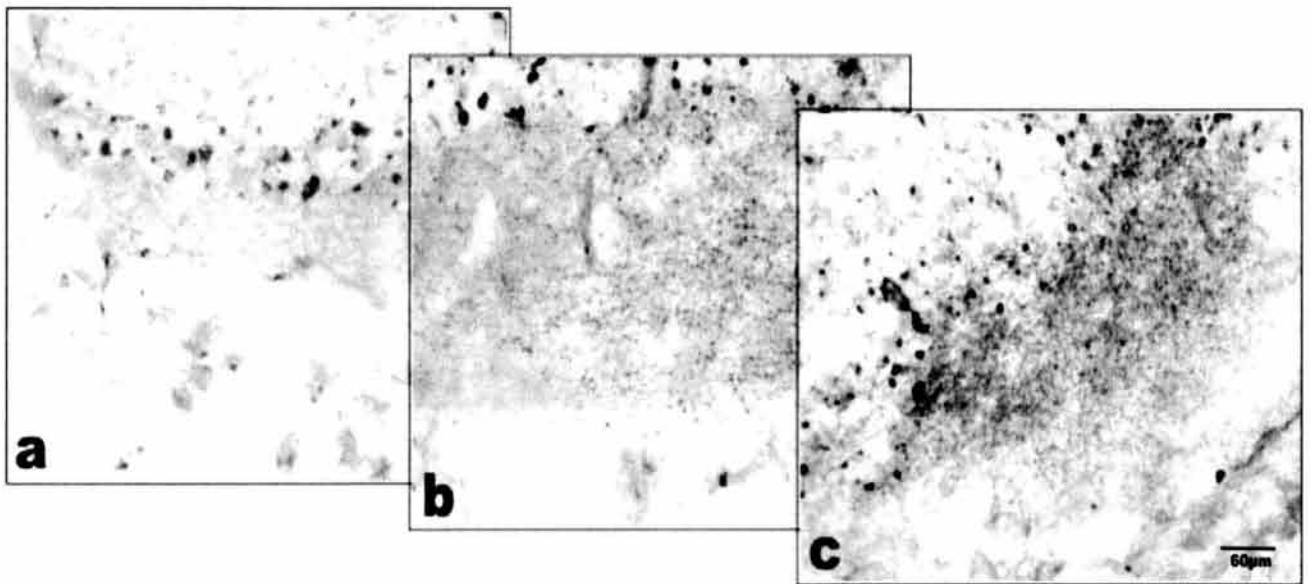


Figura 4. fotomicrografías que muestran los parámetros utilizados para valorar cualitativamente la densidad de las fibras nerviosas positivas a la NADPH-d en las diferentes regiones cerebrales del axolotl; a) escasa, b) media, c) alta.

Etapas embrionarias

Las etapas embrionarias del desarrollo del *A. mexicanum* comprenden desde la primera división celular etapa 1, hasta las etapas 41-42 (10 días de desarrollo) (ver anexo I). Nuestro estudio comenzó a partir de la etapa 13 (56 h) que es el momento en que inicia la neurulación.

Etapa 13 (56 h) hasta los 7 días. En los embriones de la etapa 13 (56 h después de la primera división celular) hasta el día 7 de desarrollo no se observó presencia de actividad a la NADPH-d ni inmunorreactividad a la nNOS.

Días 8-12. Estos días corresponden, según las tablas de Schreckenber y Jacobson, a la etapa de 35-42. Los embriones tienen un tamaño aproximado de entre 9 y 12 mm y ya realizan movimientos lentos dentro del huevo. En una vista sagital del cerebro se observa una pronunciada curvatura fronto-ventral del cerebro (Fig. 5). En un corte coronal de la parte más anterior, en la área ventral se observa parte del diencefalo y en la parte dorsal el mesencefalo. Hasta este día aun no se ha desarrollado el telencefalo. En los días 8-10 del desarrollo del axólotl los núcleos cerebrales aun no están bien definidos. La descripción de la localización de las fibras y neuronas con marca se refiere por regiones cerebrales, o sea rombencefalo, mesencefalo, diencefalo y telencefalo. La tinción positiva se observó a partir del día 8. Tanto en el día 8 como en el 10 se observaron neuronas (15 y 18 μm) fuertemente marcadas en grupos (de 3 a 6 por corte) (Fig. 5 j; Fig. 11 A). Estas neuronas se localizaron en la parte media caudal del rombencefalo, (Fig. 5 j; Fig. 11 A). En las demás regiones del cerebro se observó únicamente una densidad media de fibras nerviosas marcadas a la NADPH-d, las cuales fueron más evidentes con la técnica histoquímica que con la inmunohistoquímica, característica que se presentó en los siguientes días del desarrollo. En el día 12 (etapa 42) observamos neuronas marcadas en la parte caudal del rombencefalo. En esta etapa del desarrollo se observó claramente que la marca se encontraban dentro del núcleo reticular inferior (NRI) (Fig. 6 p-q) con un numero mayor de neuronas marcadas (5 a 6 por corte). Con una densidad media de fibras marcadas. Además, en esta región observamos tractos nerviosos fuertemente marcado que posiblemente vengan del tecum, por lo que es un tracto espino bulbar (Fig. 6 p,q). Este tracto continua marcado hasta el adulto. En el diencefalo en la parte dorsal del tálamo (Td) y del tegmentum (TgD) observamos grupos pequeños de neuronas (2 a 3 células por corte) marcadas para la NADPH-d. En esta zona la inmunorreactividad a la nNOS se presentó en el día 13 con una densidad de fibras alta y fuertemente marcadas (Fig. 8d-j). En la zona del núcleo amigdalino (NAM) observamos grupos de dos a tres neuronas marcadas y con una densidad media de fibras (Fig. 6 f-g).

Período larval

Este periodo se inicia a partir del día 13, los embriones comienzan a tomar la forma de larva e inicia la formación de las branquias (ver anexo 1). Entre los días 14 y 16, los movimientos de las larvas son más frecuentes y en este tiempo comienza la eclosión. Una vez fuera del huevo las larvas se alimentan de los residuos del vitelo del huevo. En un corte cerebral del telencefalo, se distinguen otras estructuras como son el núcleo del fascículo medial telencefálico, los núcleos séptales, la comisura anterior e hipocampal. El palio dorsal e hipocampal aun no están bien definidos (Fig. 7). Es hasta el día 16 cuando se observa el nervio olfatorio haciendo conexión con el bulbo olfatorio. El

nervio esta formado por los axones de las células receptoras olfatorias de la cavidad nasal que hacen contacto en la capa glomerular del bulbo olfatorio.

Días 14-18. Durante este periodo las larvas tienen un tamaño de entre 12 y 14 mm y comienzan la eclosión. En este día se observaron otras áreas cerebrales marcadas. Los días 14 y 16 presentaron neuronas marcadas agrupadas, de 10 a 15 por corte, entre los núcleos amigdalino (NAM) y del fascículo medial telencefálico (NFMT), por encima de la comisura anterior (NA) y del núcleo preóptico anterior (NPA) (Fig. 7 b-f, Fig. 17 A-B). En esta área la densidad de fibras marcadas estuvo entre media y alta. En el núcleo estriado se observaron neuronas marcadas aisladas, de 1 a 2 por corte (Fig. 7 d). En el núcleo talámico dorsal se observaron neuronas marcadas en grupos aislados de 2 a 3 por corte. Mientras que en el tálamo ventral se encontraron en un grupo de 5 neuronas. En todo el núcleo talámico se observó una densidad alta de fibras marcadas (Fig. 7 h). A partir de estos días se comenzaron a observar fibras marcadas de forma vesiculada. En diencefalo fuera de las de las regiones antes mencionadas se observó una densidad media de fibras. En el mesencéfalo, se localizó un grupo de neuronas marcadas (de 2 a 4 células por corte) en la parte dorsal e ístmica del tegmentum (Fig. 7 j; Fig. 16 A, D) con una densidad alta de fibras. Además en esta zona, entre el límite del neuropilo y de los cuerpos neuronales, se observaron fascículos tegmentales fuertemente marcados, mismo que no se observaron en los siguientes días del desarrollo (Fig. 7 j; Fig.16 D). A partir del día 14, en el núcleo motor del trigémino se observaron neuronas (8 a 10 por corte) levemente marcadas. Las neuronas de este núcleo proyectan sus axones hacia la parte lateral del mesencéfalo (Fig. 7 l, Fig. 13 A). En la parte anterior de la médula oblongada se localizaron neuronas marcadas ligeramente, de 6 a 7 por corte, dentro del núcleo del tracto trigémino descendente (NVMi) (Fig. 7 m). En la parte caudal del rombencéfalo dentro del núcleo de los fascículos solitarios (NFS) se observó un grupo de neuronas marcadas, de 4 a 5. En el núcleo reticular inferior (NRi) se observaron neuronas en racimos (de 8 a 10 por corte) fuertemente marcadas (Fig. 7 n-ñ; Fig. 11 C,D). Las terminales de estas neuronas proyectan y se ramifican hacia la parte ventral del rombencéfalo, observándose en esta área una densidad alta de fibras marcadas.

Días 20 – 30. En este día las larvas tienen un tamaño de entre 15 y 20 mm. Alrededor del día 25 se inicia el desarrollo de las extremidades anteriores y en el día 30 están totalmente desarrolladas. Las branquias se observan de mayor tamaño y más arborizadas.

En el día 20, en la parte anterior del telencéfalo, se encuentra una fuerte marca en la zona glomerular del bulbo olfatorio y en el nervio olfatorio (Fig. 8 a). En el área palial y parte anterior del

núcleo amigdalino se observaron neuronas marcadas dispersas (4 a 5 por corte). En esta área hay una densidad media de fibras marcadas (Fig. 8 c). Entre los núcleos amigdalino, del fascículo medial telencefálico (NFMT) y del núcleo preóptico se observaron un numero mayor de neuronas marcadas alineadas (10 a 12 por corte). Esta área vista en un corte coronal, las neuronas se localizaron alineadas en el limite del neuropilo y los cuerpos neuronales. La densidad de fibras en esta región fue alta (Fig. 8 c-d). En la parte dorsal del tálamo y en los núcleos paraventriculares se observaron grupos de neuronas marcadas (2 a 4 por corte) con una densidad media de fibras marcadas (Fig. 8 f-g). En el mesencéfalo dentro del tegmentum istmico se localizaron neuronas marcadas en grupos (3 a 4 por corte) con una densidad media de fibras (Fig. 8 h). El núcleo motor del trigémino mostró un mayor numero de neuronas marcadas intensamente (14 a 15 por corte) (Fig. 8 i-k), con una densidad alta de fibras. En el rombencéfalo, las neuronas marcadas (6 a 7 por corte) se encontraron en el núcleo del tracto descendente trigémino, localizado en la parte anterior de la médula oblongada (Fig. 8 l). Posteriormente, en el núcleo reticular inferior se encontraron grupos de neuronas marcadas (8 a 9 por corte) (Fig. 8 m). La densidad de fibras en esta área fue alta.

En el día 30, en el palio hipocampal se observaron neuronas marcadas aisladas, la densidad de fibras fue escasa (Fig. 9 a-b, Fig. 18 A). Como se describió en el día 12, las fibras nerviosas se observaron bien definidas y marcadas en todos los núcleos cerebrales. En el área glomerular del bulbo olfatorio la marca fue fuerte. En el diencefalo, como se describió anteriormente, los núcleos amigdalino, del fascículo medial telencefálico y del preóptico presentaron neuronas fuertemente marcadas con la misma disposición que en el día 20 (10 a 12 por corte). La densidad de fibras fue media (Fig. 9 c-e, Fig. 17 D). En el área talámica dorsal y ventral se observaron neuronas marcadas agrupadas (4 a 5 por corte) (Fig. 9 f-g), además se observó una densidad media de fibras. En los núcleo paraventricular hipotalámico se observaron neuronas marcadas aisladas (1 por corte) y una densidad media de fibras (Fig. 9 g). En el mesencéfalo, en el área dorsal del tegmentum y en la parte del istmo se localizaron neuronas marcadas en grupos de 3 a 4 por corte con una densidad media de fibras (Fig. 9 h-i). En el núcleo del nervio oculomotor se observó un grupo de neuronas con una tinción tenue (Fig. 15A). El núcleo motor del trigémino mostró un mayor numero de neuronas marcadas fuertemente (20 a 22 por corte) y una densidad media de fibras. En el rombencéfalo dentro del núcleo reticular inferior se encontraron neuronas marcadas (12 a 14 por corte) con una densidad alta de fibras (Fig. 9 j-l, Fig. 13 D).

60 días ~ 10 meses. A los 60 días del desarrollo, las larvas tienen un tamaño aproximado de 4.0 cm de largo y en el décimo mes de 20 cm. Son mas activas y su alimentación es a base de

pequeños crustáceos (artemias, dafnias, etc.) y peces pequeños. A los 3 meses, las extremidades posteriores comienzan a formarse y a los 10 meses se encuentran bien desarrolladas.

En el periodo de los 60 días a los 10 meses de desarrollo larvario se observó un aumento en el número de neuronas y fibras marcadas. En el telencéfalo dentro de toda el área palial (piriforme, hipocámpal y dorsal) se localizaron neuronas marcadas aisladas (7 a 14 por corte) (Fig. 18 D, E). En el núcleo anterior del bulbo olfatorio (NAO) y en el estriado se observaron neuronas agrupadas (5 a 10 por corte). En el diencéfalo se observó un mayor número de neuronas marcadas (17 a 30 por corte), principalmente en el núcleo del fascículo medial telencefálico. Cerca de esta zona, a los 10 meses, se observó una fuerte marca en las fibras que al parecer conforman los fascículos medial y lateral telencefálico (Fig. 10 f; Fig. 19 E, F). En el adulto esta zona sigue teniendo una marca fuerte. En el mesencéfalo dentro del núcleo oculomotor se observa un grupo grande de neuronas (10 a 14 por corte). El núcleo interpeduncular mostró un grupo de neuronas fuertemente marcadas (6 a 7 por corte). El núcleo motor del trigémino, como se observó en los días anteriores, mostró un mayor número de neuronas intensamente marcadas (20 a 30 por corte) (Fig. 10 j-k; Fig. 15 G). En un corte coronal de esta área en el mes 10 se observó el fascículo tegmental profundo marcado fuertemente. Este fascículo está dispuesto de una manera dorsoventral y sale del núcleo motor del trigémino para dirigirse hacia el núcleo interpeduncular (Fig. 10 k). En un corte parasagital de esta zona se observa el tracto tegmental pedúncular marcado fuertemente (Fig. 10 k). Este tracto sale desde el tegmentum y cruza el núcleo ístmico y núcleo motor del trigémino para dirigirse hacia la parte ventral del pedúnculo. En el tectum, se observaron neuronas aisladas marcadas localizadas en las capas de la 5 a 7, (Fig. 10 j, Fig. 14 A, B). En el rombencéfalo, se localizó un mayor número de neuronas marcadas (12 a 15 células por corte) en comparación con las etapas anteriores y con la misma localización con la diferencia de que en días anteriores se observaron las neuronas en racimos y en este caso se encontraron separadas (Fig. 12 m), localizadas en la salida de los nervios craneales noveno y décimo. Las neuronas tenían un diámetro aproximado de entre 18 y 25 μm y claramente se observaron las prolongaciones de las neuronas marcadas ramificarse hacia la parte ventral del rombencéfalo. En ocasiones se observaron neuronas marcadas rodear a los vasos sanguíneos de esta región.

En la tabla VI se resumen los resultados obtenidos de la distribución neuroanatómica de la NADPH-d y la nNOS en cada una de las estructuras cerebrales por día del desarrollo del *A. mexicanum*.

Figuras 5-10. Esquemas de cortes coronales del cerebro del axolotl *A. mexicanum* a los 8, 12, 16, 20, 30 días y 10 meses de desarrollo respectivamente donde se muestra la distribución de las neuronas (●), fibras nerviosas (+) y fascículos de fibras nerviosas (*) positivas a la NADPH-d y a la nNOS. La densidad de fibras se marca como: (+) escasa, (++) media y (+++) alta. La línea discontinua representa el límite entre la sustancia blanca y la sustancia gris.

Abreviaciones :

BO bulbo olfatorio	NRi núcleo reticular inferior
d día	NTrgm núcleo motor del trigémino
c cartílago	NVM
Cb cerebelo	NIII núcleo del nervio oculomotor
DI diencéfalo	NVIII
EO epitelio olfatorio	Oj ojo
ER epitelio respiratorio	PdT parte dorsal talámica
ftp fascículo medial telecefálico	PdV parte ventral talámica
Hb habenula	PD palio dorsal
Hp hipófisis	Ped pedúnculo
Ht hipotálamo	PHp palio hipocampal
In infundíbulo	PP palio piriforme
m mes	PTc pretectum
ME mesencéfalo	Ro rombencéfalo
Na narina	Tc tectum
NAc núcleo acumbens	Td tálamo dorsal
NAm núcleo estriadoamigdalino	TgD tegmentum dorsal
NAO núcleo anterior olfatorio	Tg I tegmentum ístmico
NE núcleo estriado	TE telencéfalo
NFMT núcleo del fascículo medial telencefálico	Tv tálamo ventral
NFS núcleo del fascículo solitario	V ventrículo
NI núcleo interpeduncular	VL ventrículo lateral
NO nervio olfatorio	IIIv tercer ventrículo
NPA núcleo preóptico anterior	
NPo núcleo preóptico	
NPvHt núcleo para ventricular hipotalámico	
NS núcleos séptales	

8d

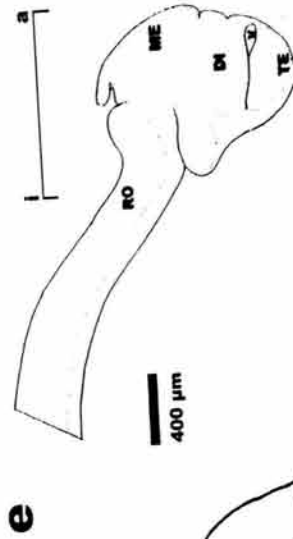
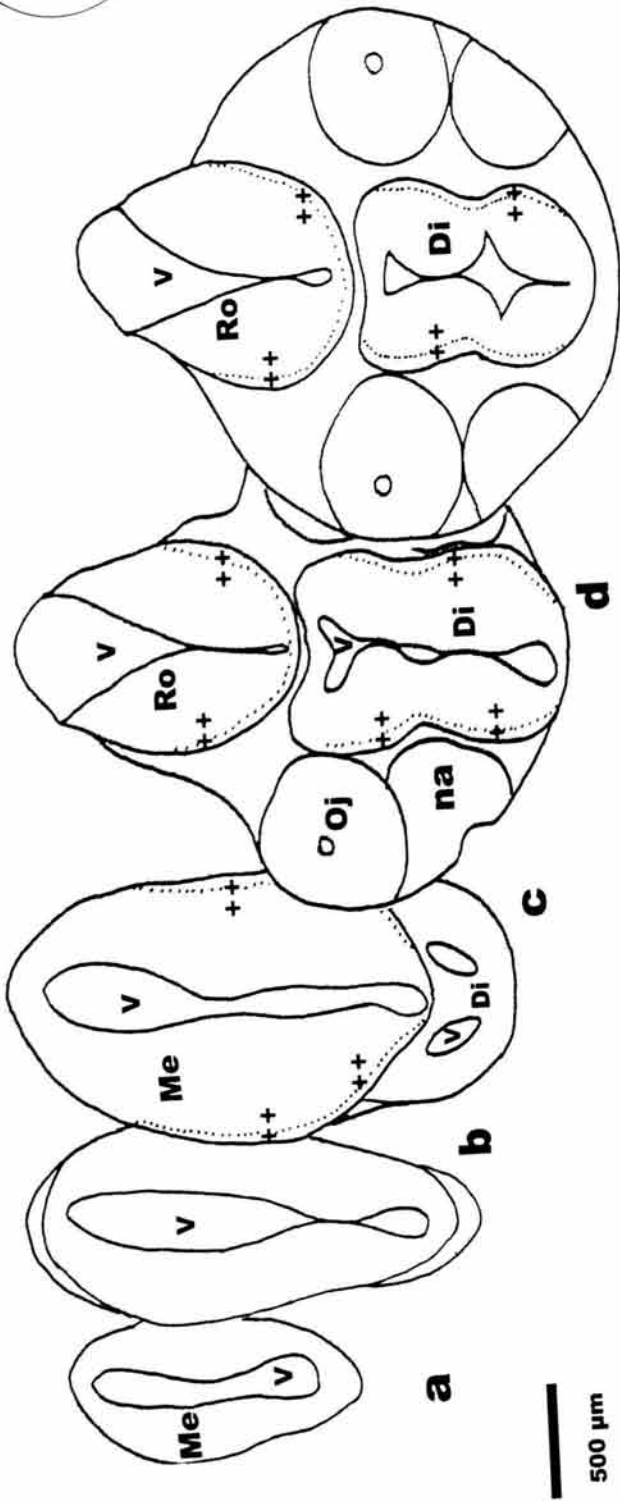
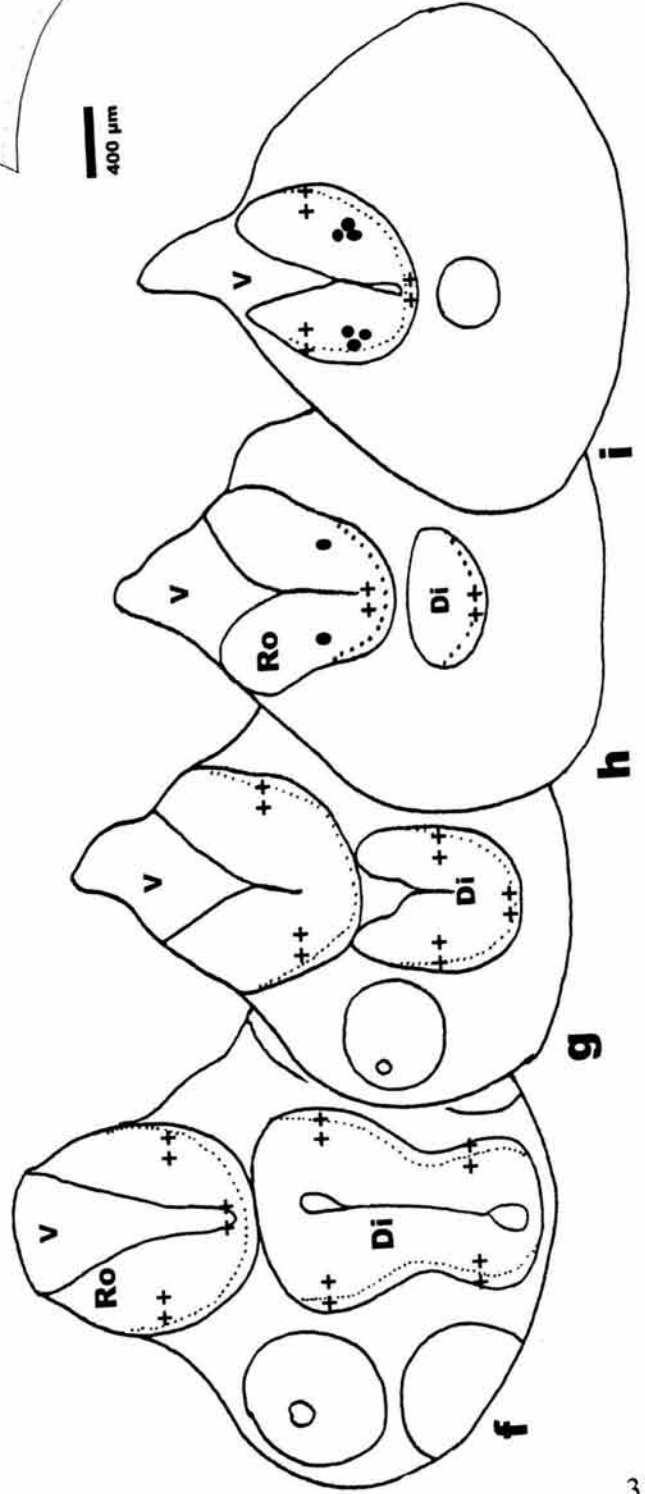


Fig. 5



12d

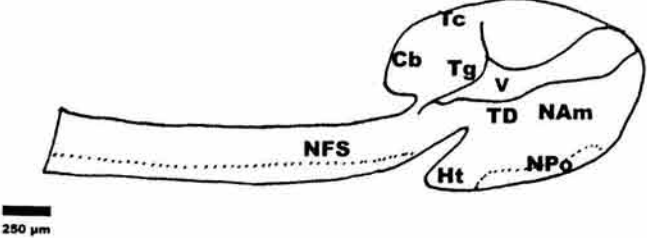
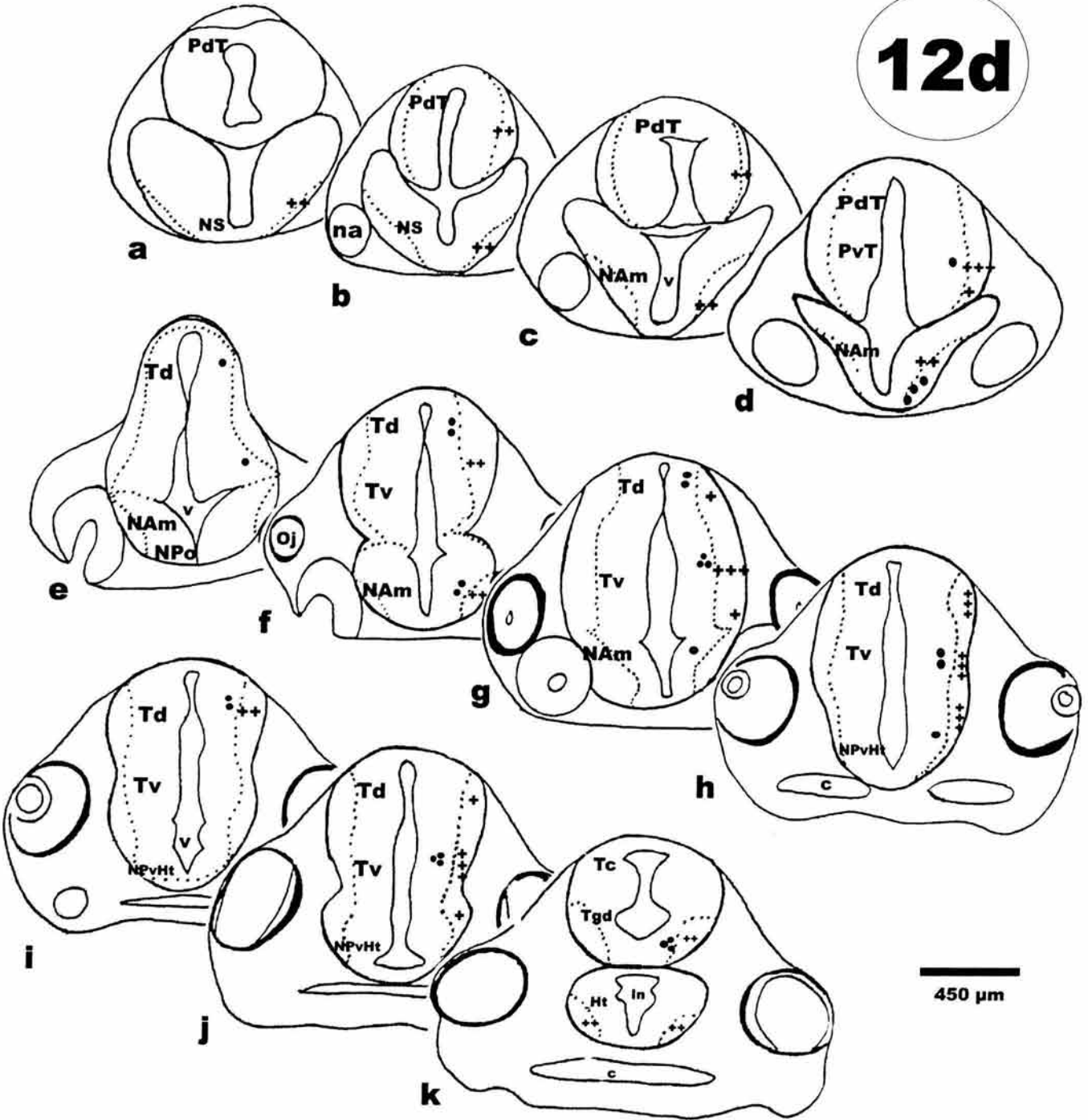
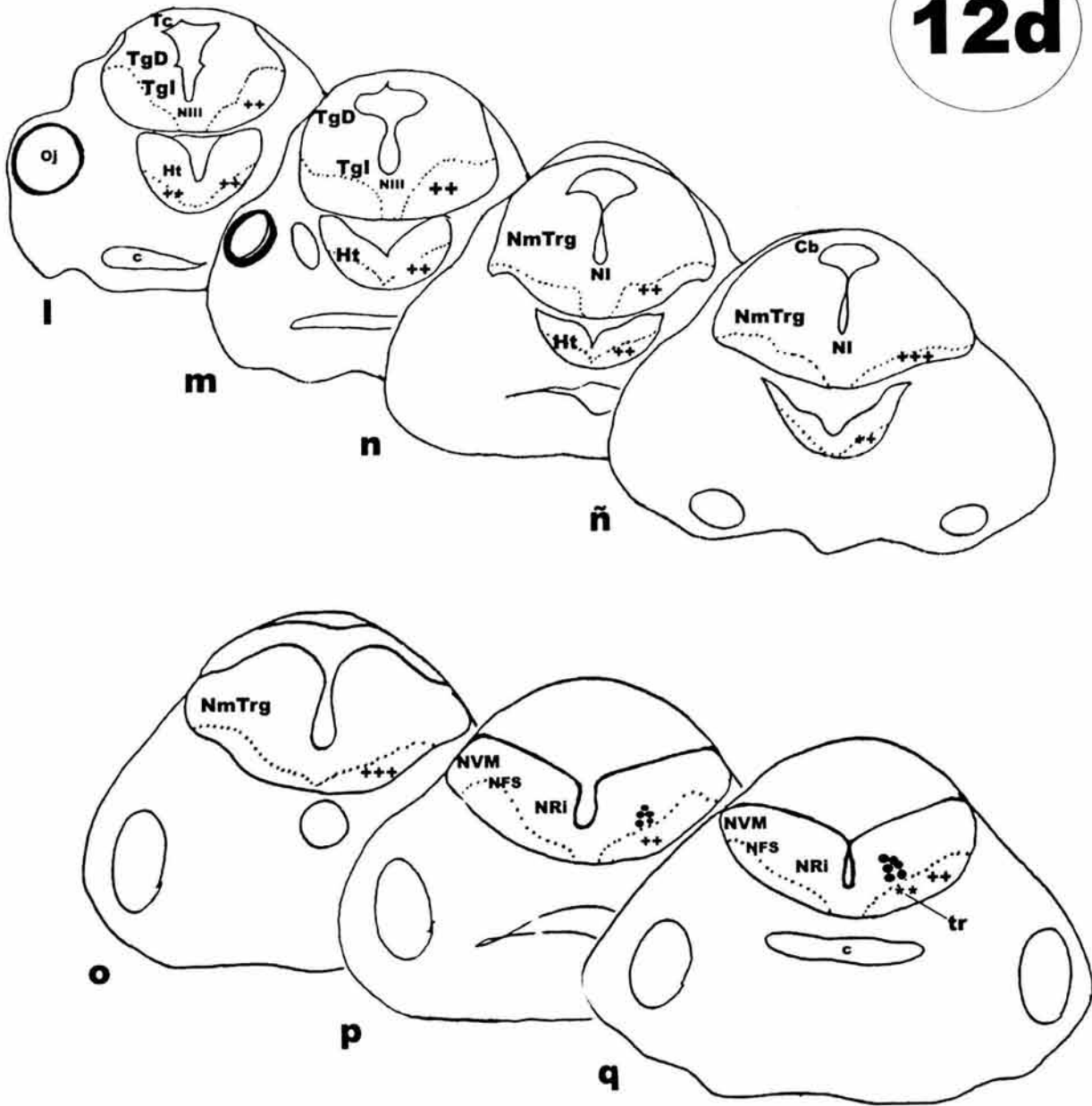


Fig. 6

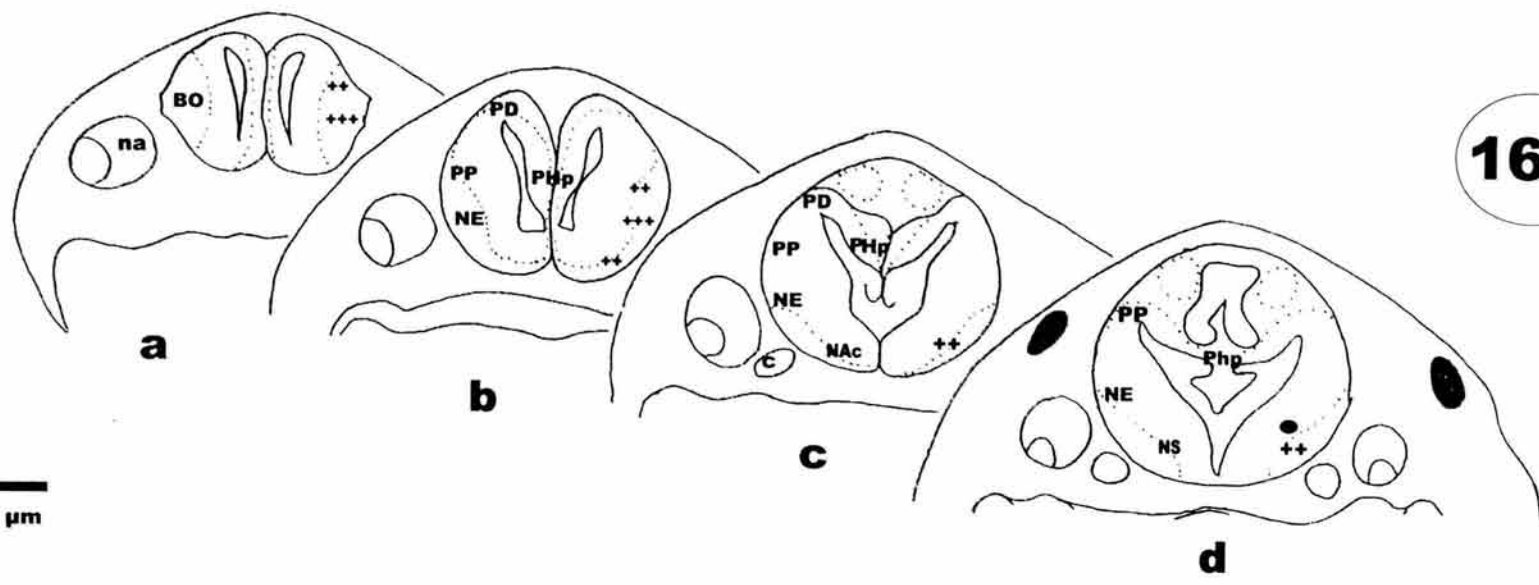
12d



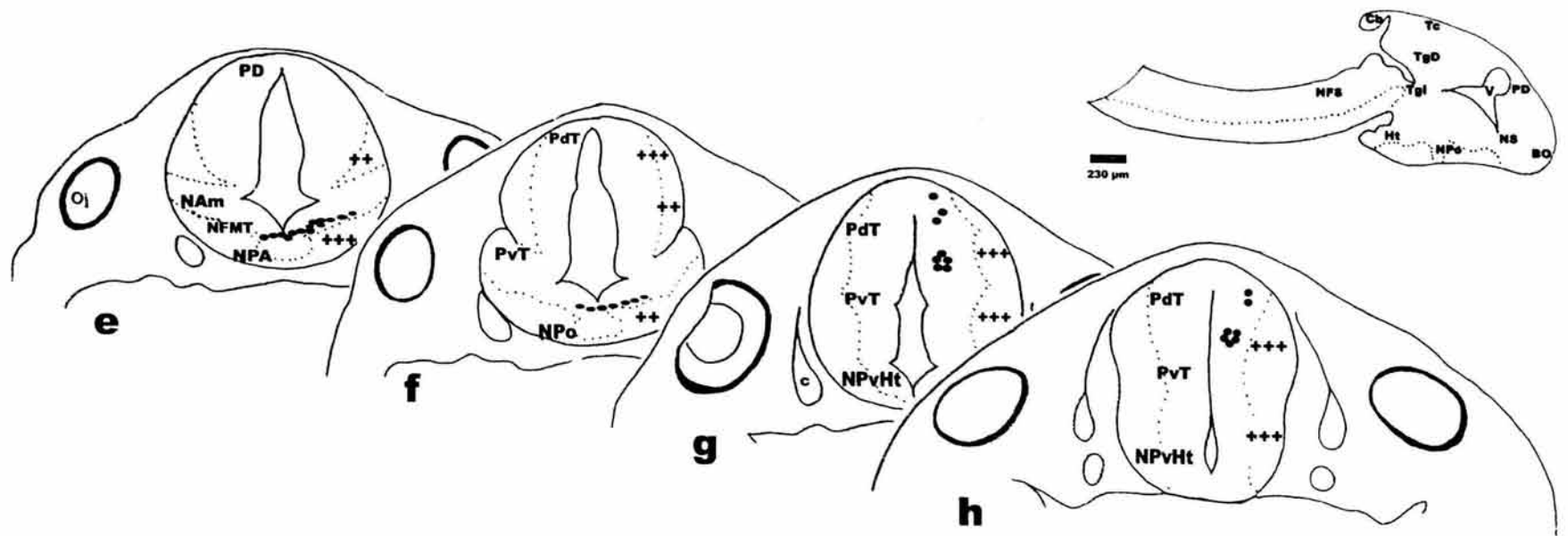
440 μ m

Fig. 6

16d



400 μm



230 μm

Fig. 7

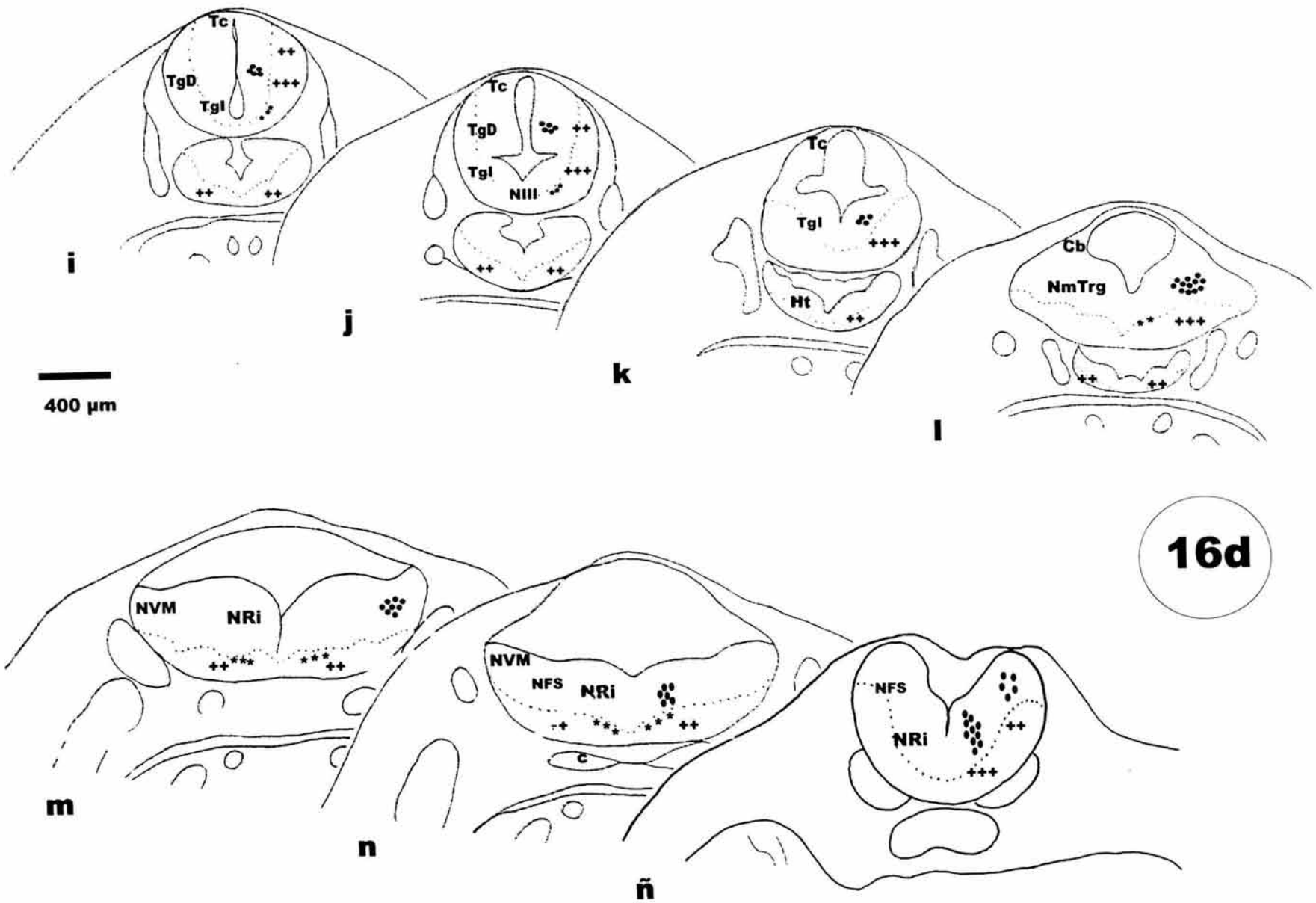


Fig. 7

20d

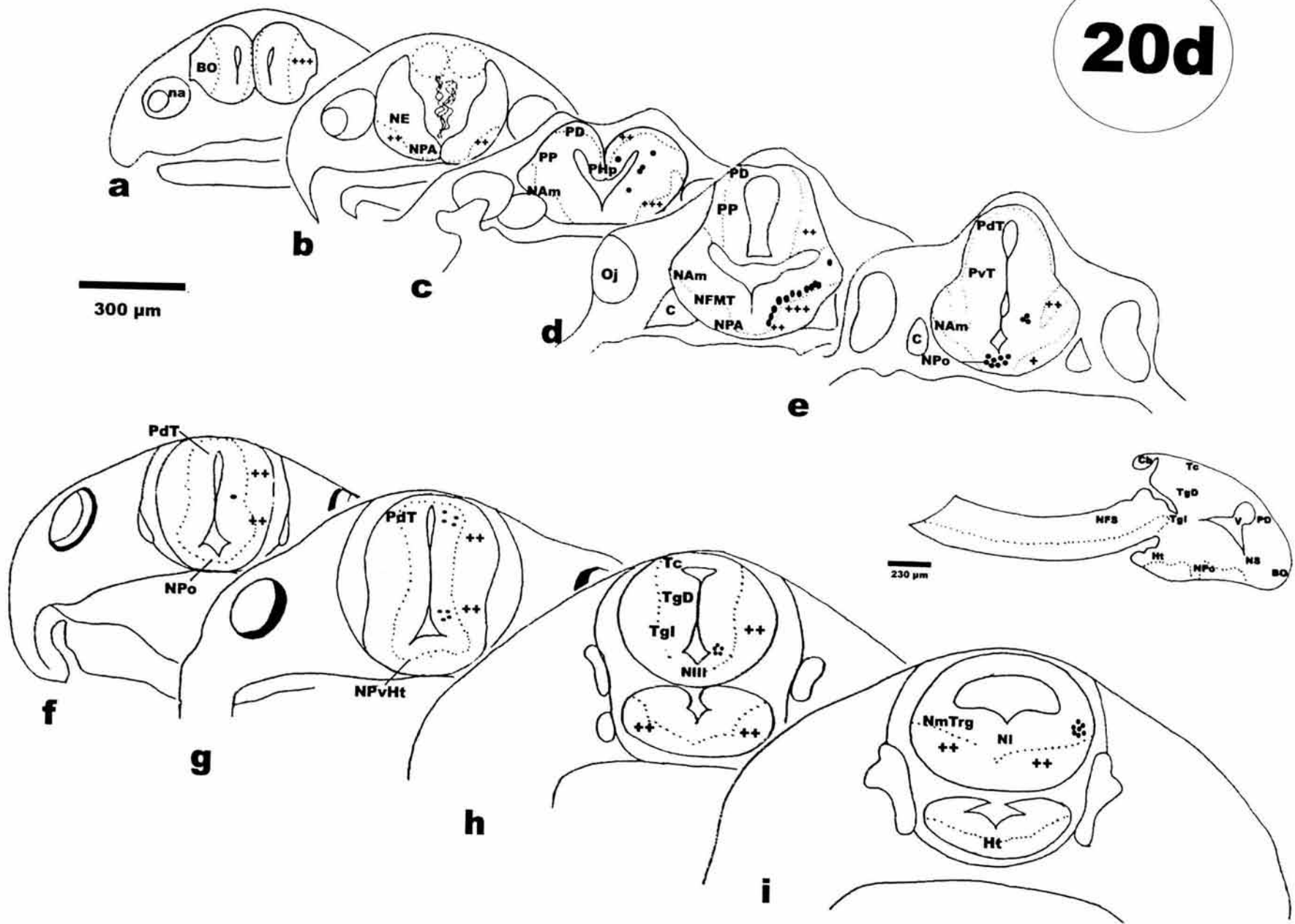
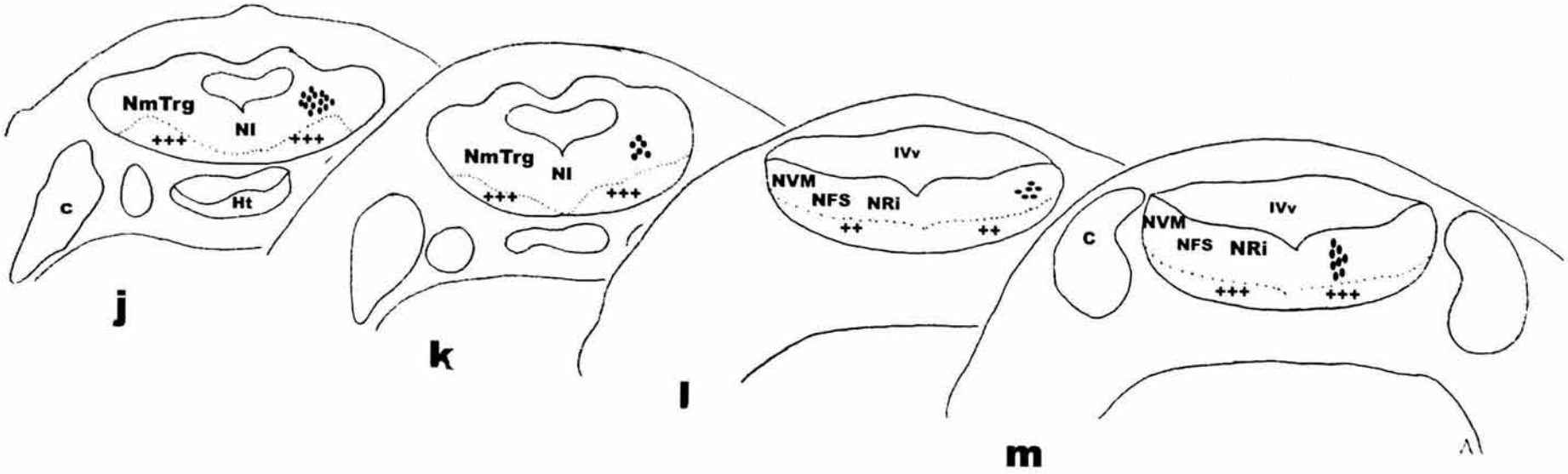


Fig. 8

20d



300 μ m

Fig. 8

30d

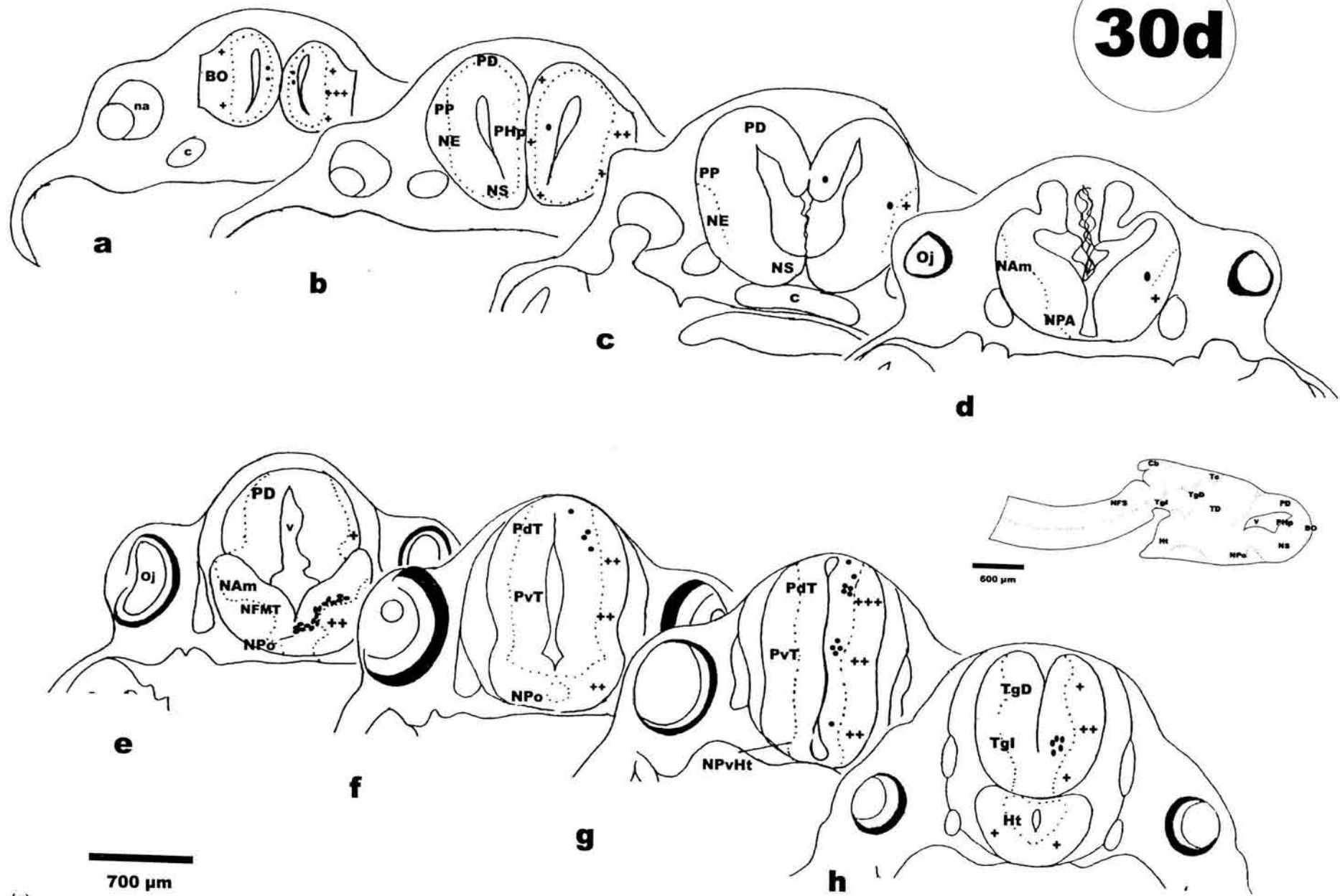


Fig. 9

30d

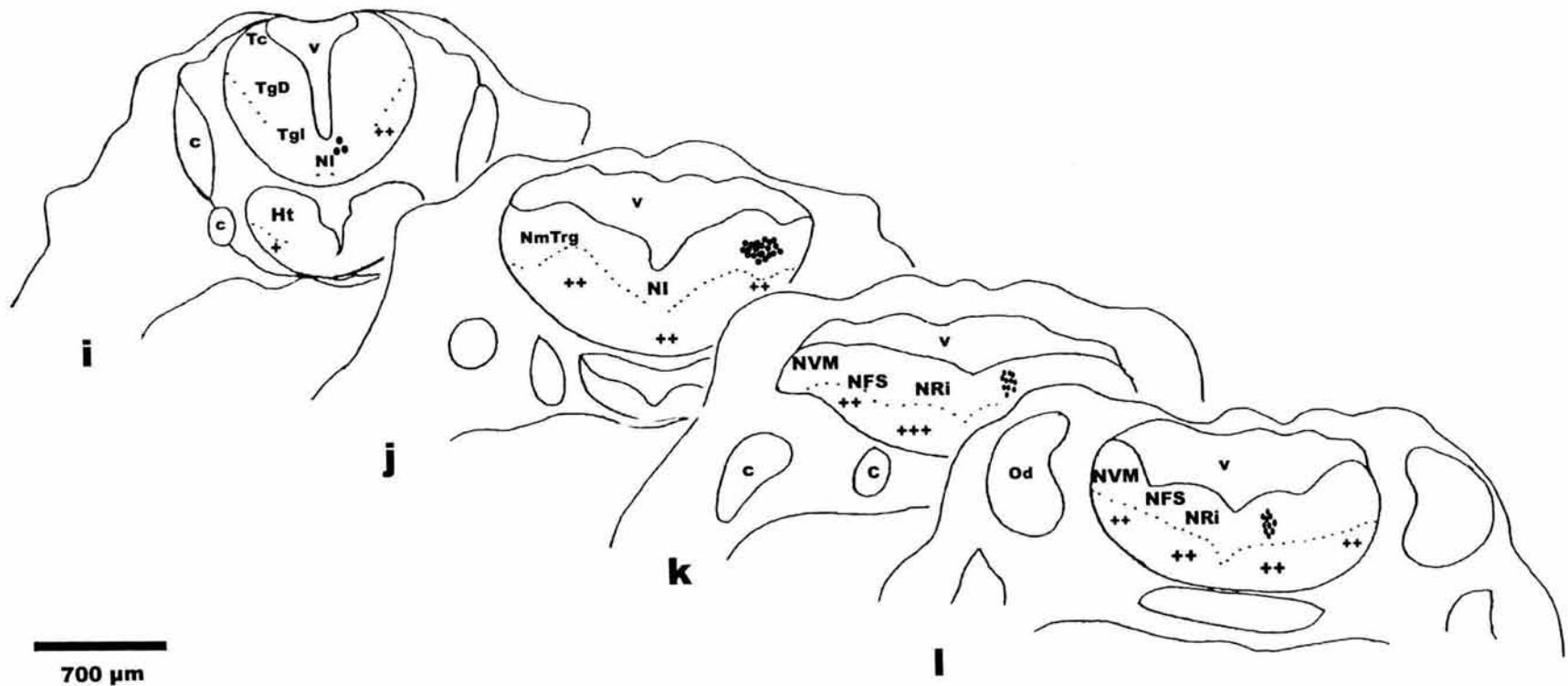


Fig. 9

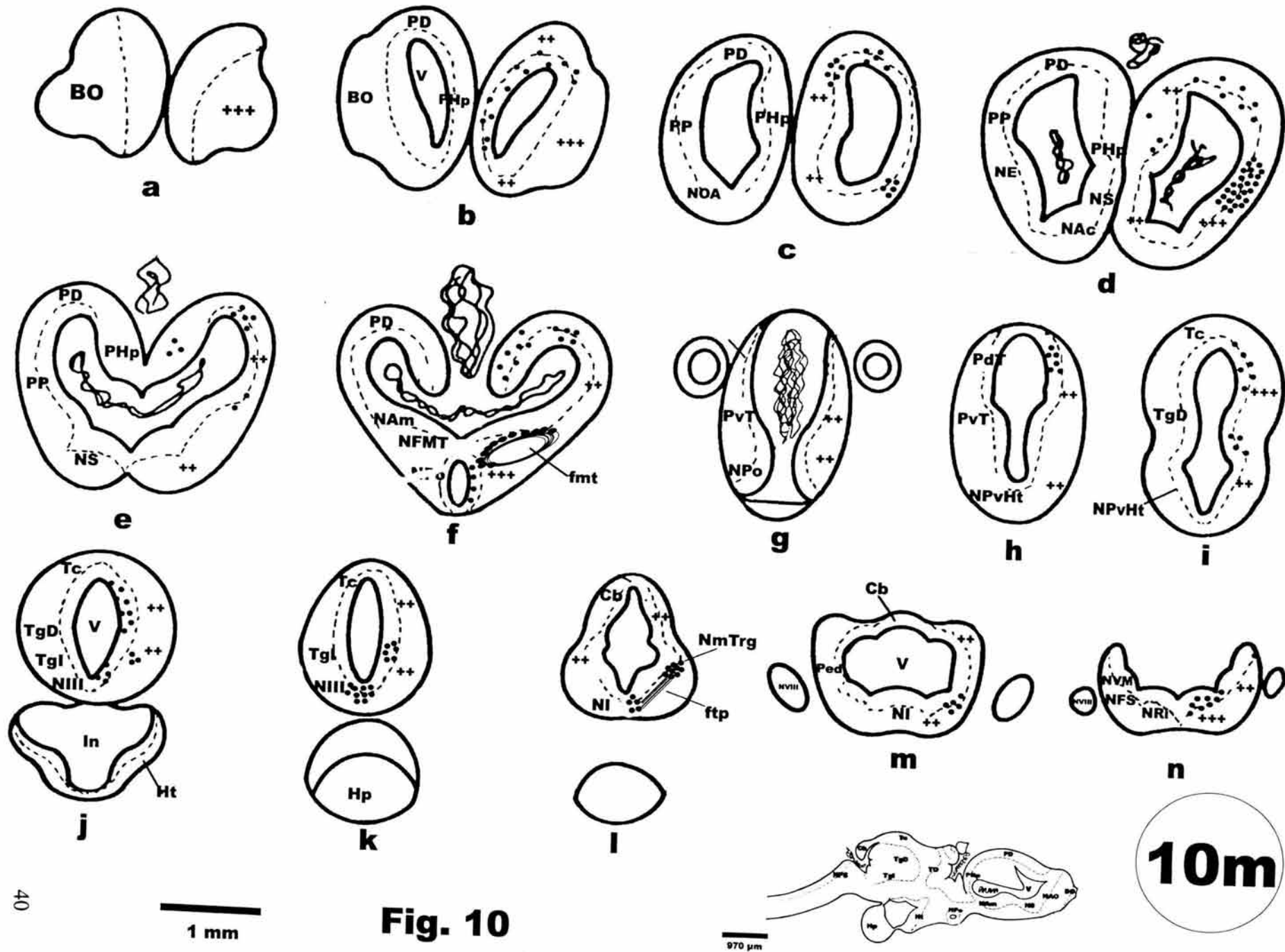


Fig. 10

Tabla V. Distribución de la NADPH-d y de la nNOS en el desarrollo del SNC y SNP del axolotl, <i>Ambystoma mexicanum</i>												
Día / Región	8d	10d	12d	14d	16d	18d	20d	30d	60d	90d	6M	10m
TELENCEFALO												
Bulbo olfatorio												
Núc. Olfatorio anterior												
Palio dorsal												
Palio piriforme												
Palio hipocampal												
Núcleos septales												
Núcleo acumbens												
Núcleo estriado												
Núcleo amigdalino												
Núc. del fascículo medial telencefálico												
Núcleo caudado												
DIENCÉFALO												
Núc. Preóptico ant.												
Núc. Preóptico												
Tálamo dorsal												
Tálamo ventral												
Núc. Paraventricular hpth.												
Hipotálamo												
MESENCÉFALO												
Tectum												
Tegmentum dorsal												
Tegmentum ístmico												
Núc. Motor del trigémimo												
Núc. oculomotor												
Núc. interpeduncular												
Cerebelo												
ROMBENCEFALO												
Medula oblongada												
Núcleo del trac. Desc. Del trigémimo												
Núcleo del tracto solitario												
Núcleo reticular inferior												
Neuromastos												
Epitelio nasal												

Figura 11. Localización de neuronas (↑) y fibras (*) positivas a la NADPH-d (A, C, G) e inmunorreactividad a la nNOS (B, D, E, F) en fotomicrografías de cortes coronales de la **parte caudal del rombencéfalo** dentro del núcleo reticular inferior (**NRi**) en los días de desarrollo 8 (A,B), 16 (C,D), 30 (E) y 90 (F,G). **Barras:** 40 μm (A,B,E), 16 μm (C, D, F, G).

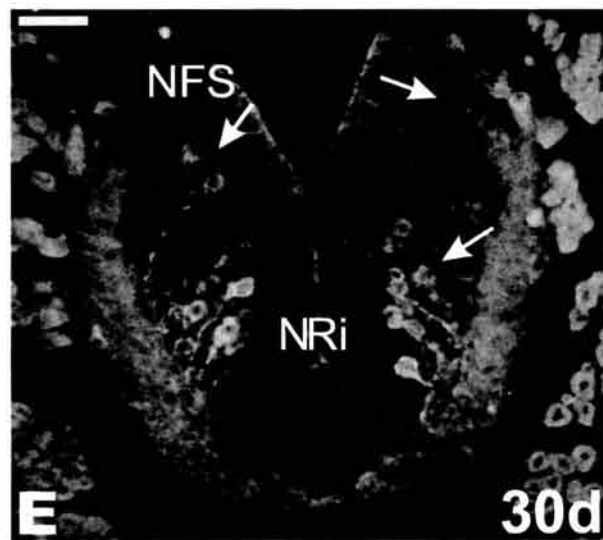
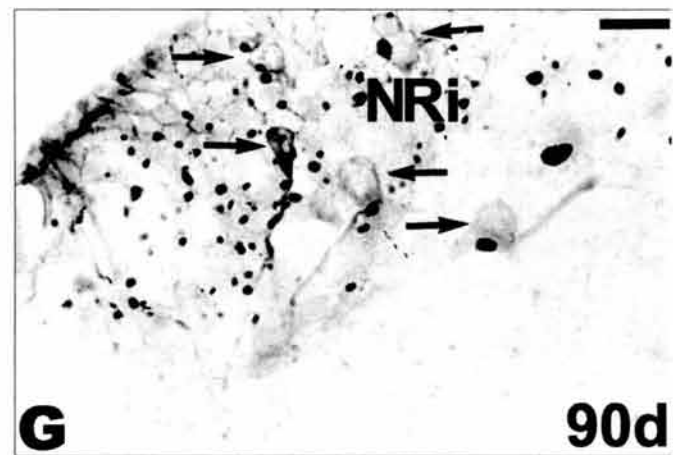
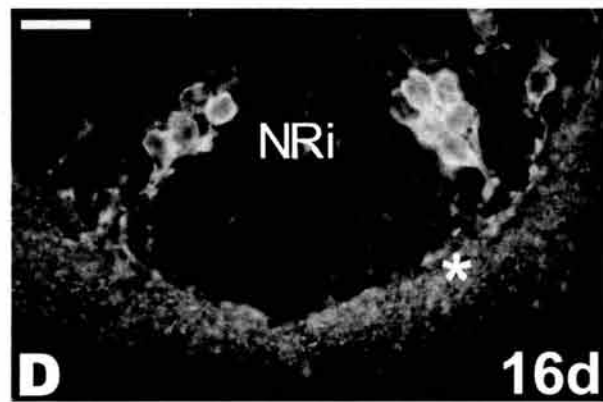
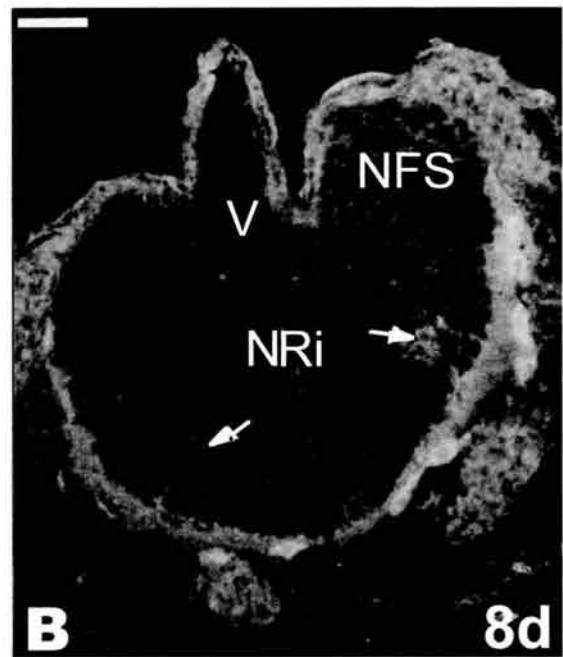
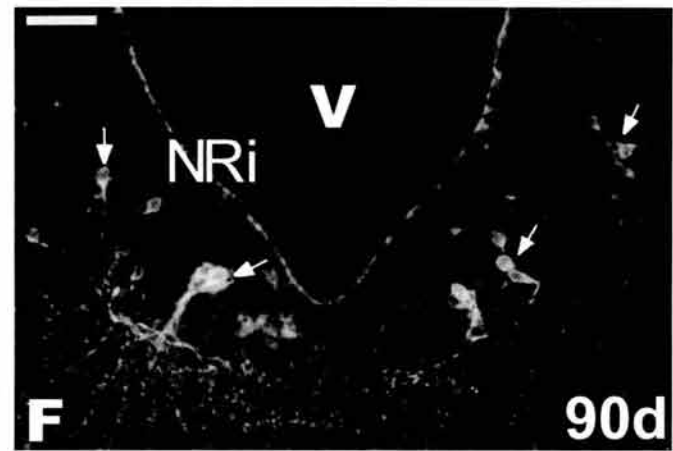
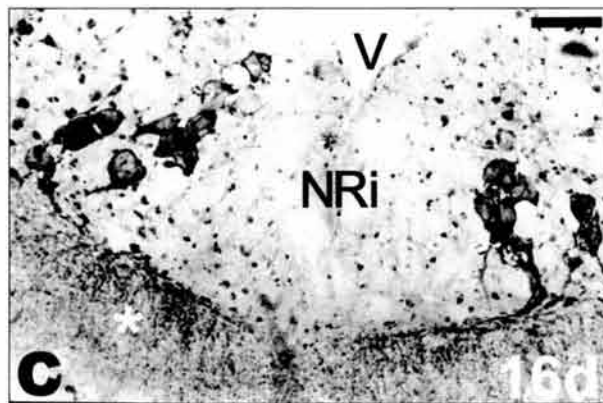
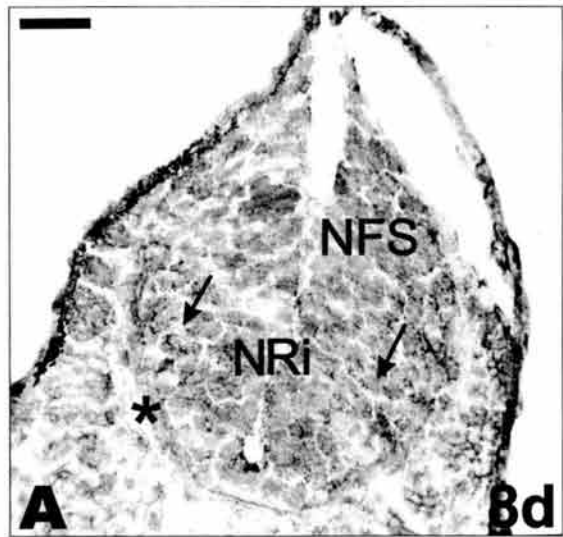


Figura 12. Localización de neuronas (↑) y fibras (✱) positivas a la NADPH-d (A, B, D, E) e inmunorreactividad a la nNOS (C) en fotomicrografías de cortes de la **parte anterior del rombencéfalo** dentro del núcleo reticular inferior (**NRi**) en los días de desarrollo 10, 18, 30 y mes 10. **Barras:** 100 μm (A), 40 μm (B,C,E), 16 μm (D).

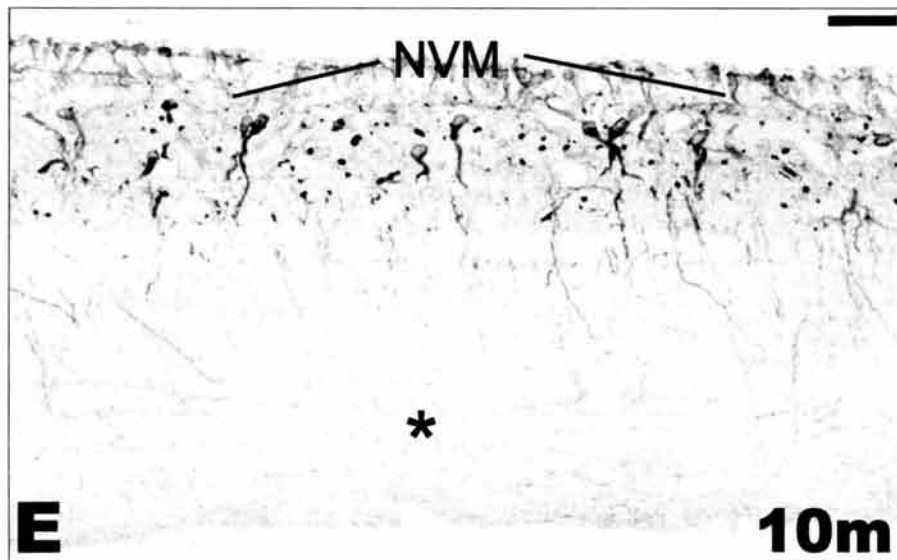
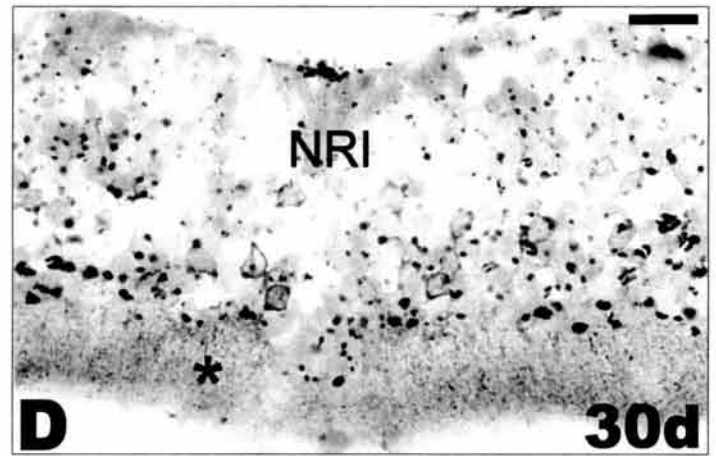
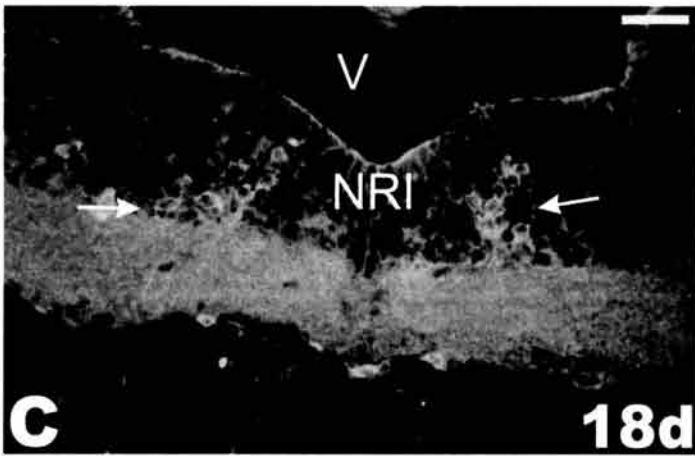
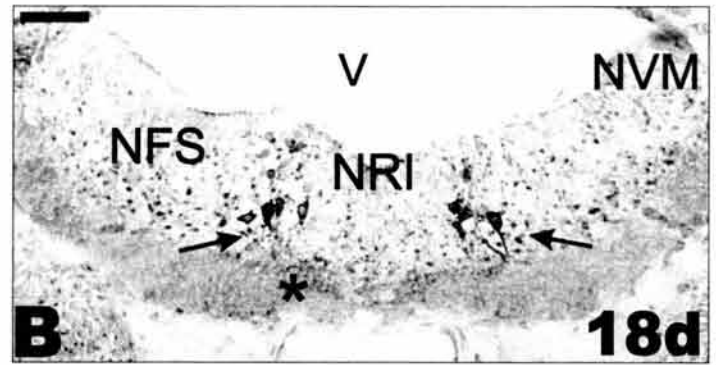
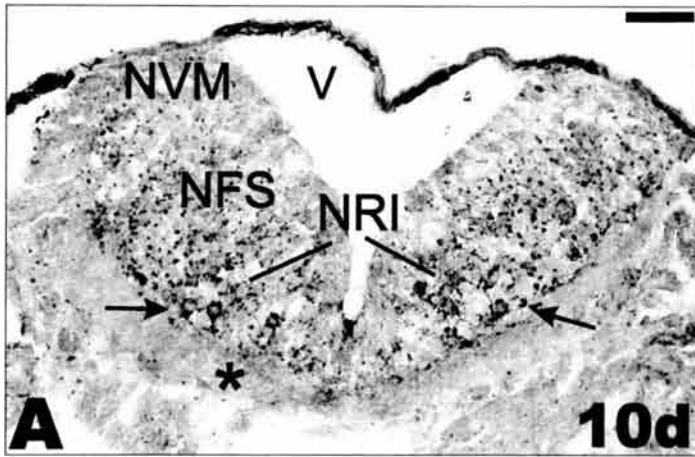


Figura 13. Localización de neuronas (↑) y fibras (✱) positivas a la NADPH-d (A, B, C, F, G) e inmunorreactividad a la nNOS (D, E) en fotomicrografías de cortes del **núcleo motor del nervio del trigémino (NmTrg)** en los días 14, 20, 30, 60 y 10 meses. Nótese el incremento del número de neuronas y de la intensidad de la marca del día 14 a los 10 meses. Barras: 40 μm (A,B,E,F,G), 16 μm (C,D).

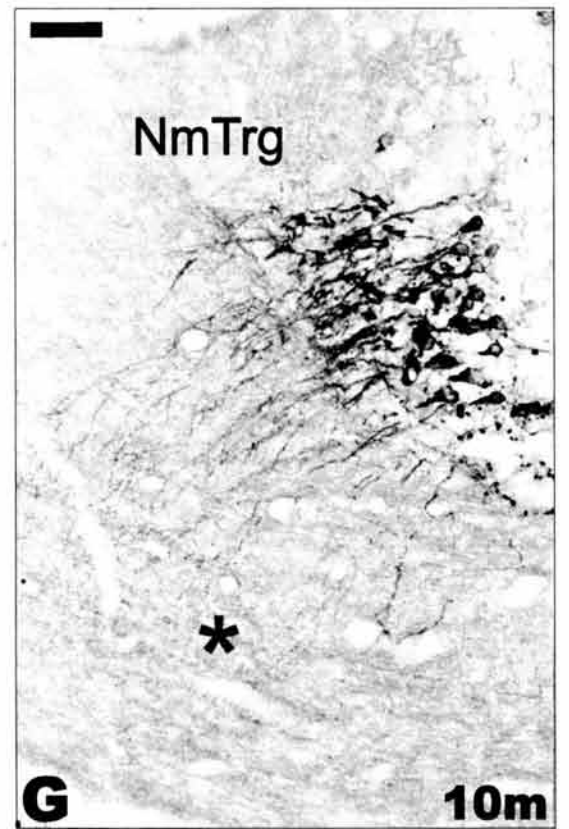
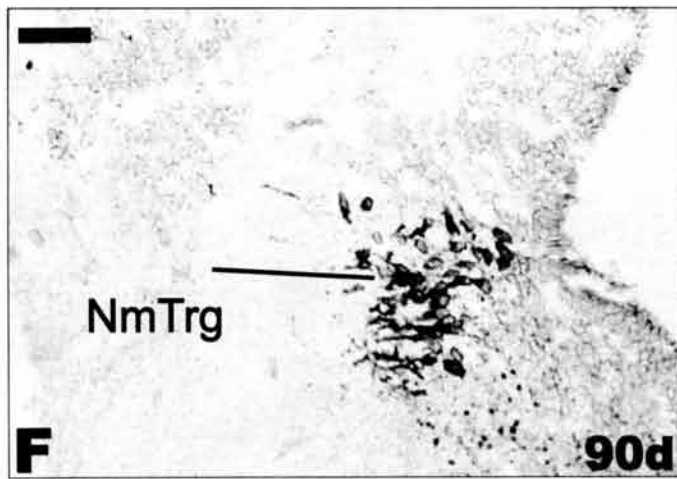
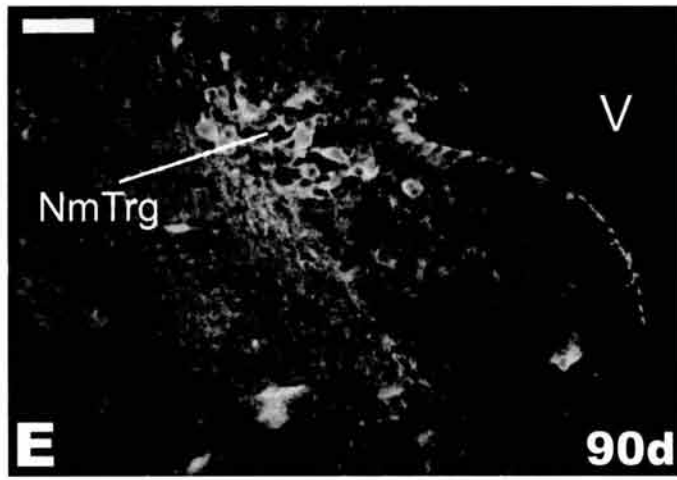
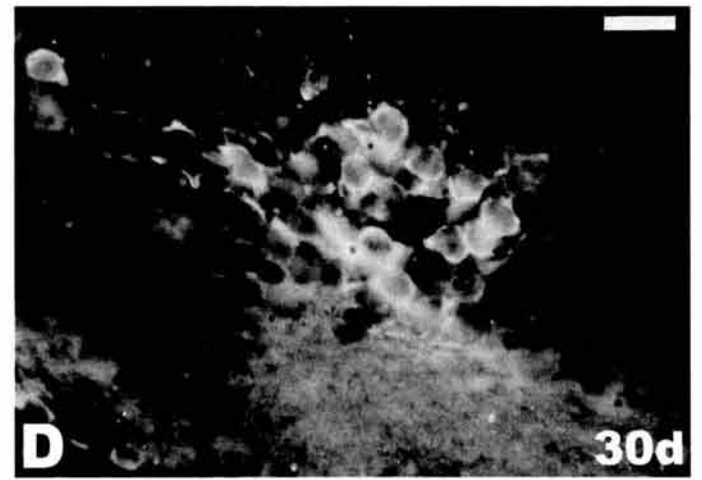
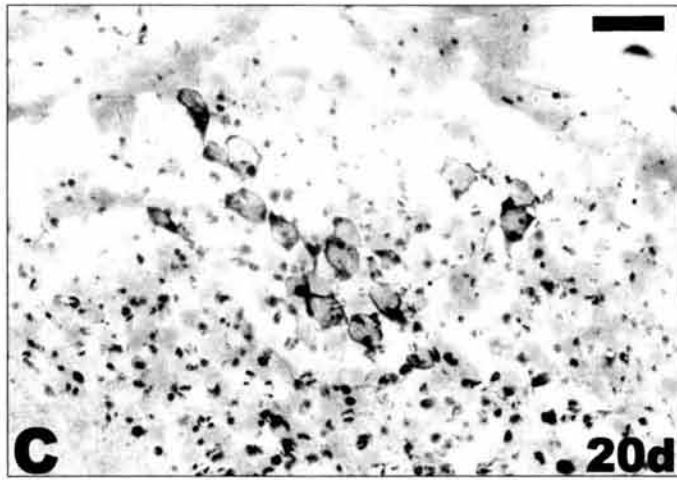
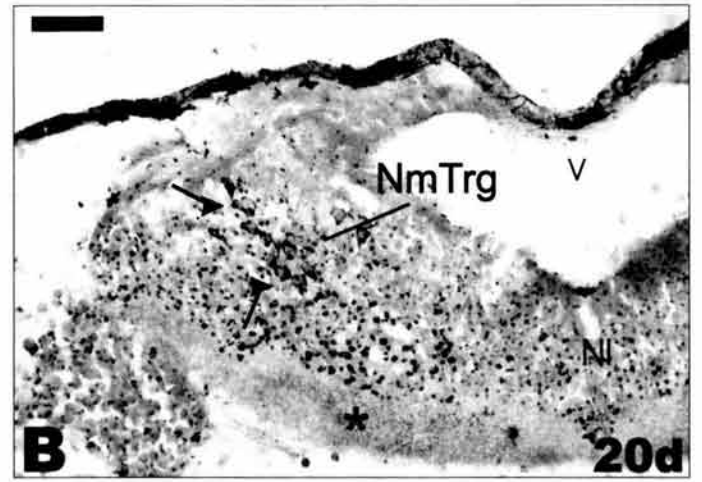
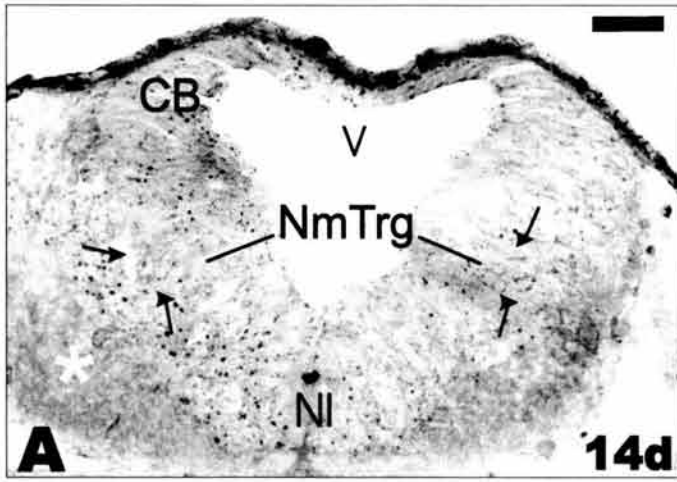


Figura 14. Localización de neuronas (↑) y fibras (✱) positivas a la NADPH-d en fotomicrografías de cortes sagitales del **tectum** (Tc) en el mes 10. **A.** Numerosas positivas a la NADPH-d (↑). Nótese la fuerte tinción a la NADPH-d en el tracto tecto-tegmental-peduncular (▲) localizado en la parte ventral del mesencéfalo. **B.** Neuronas (↑) y fibras (✱) positivas a la NADPH-d localizadas en las capas 7 y 6 del tectum. **Barras:** 40 μm (A), 16 μm (B).

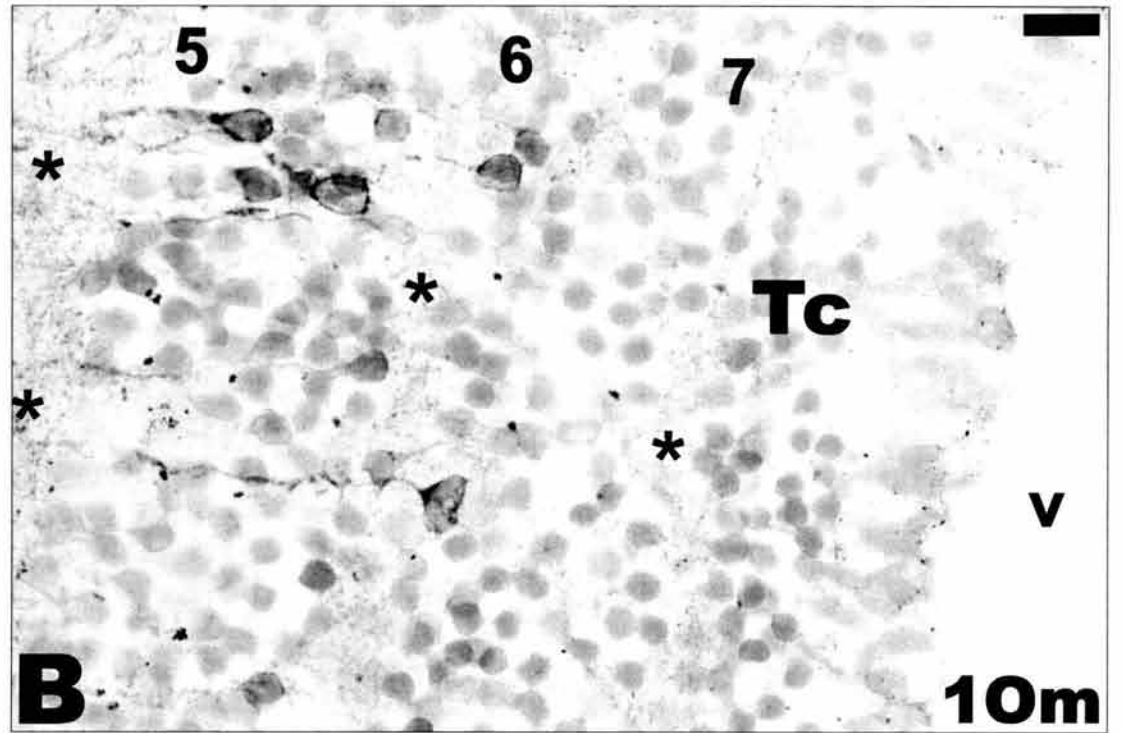
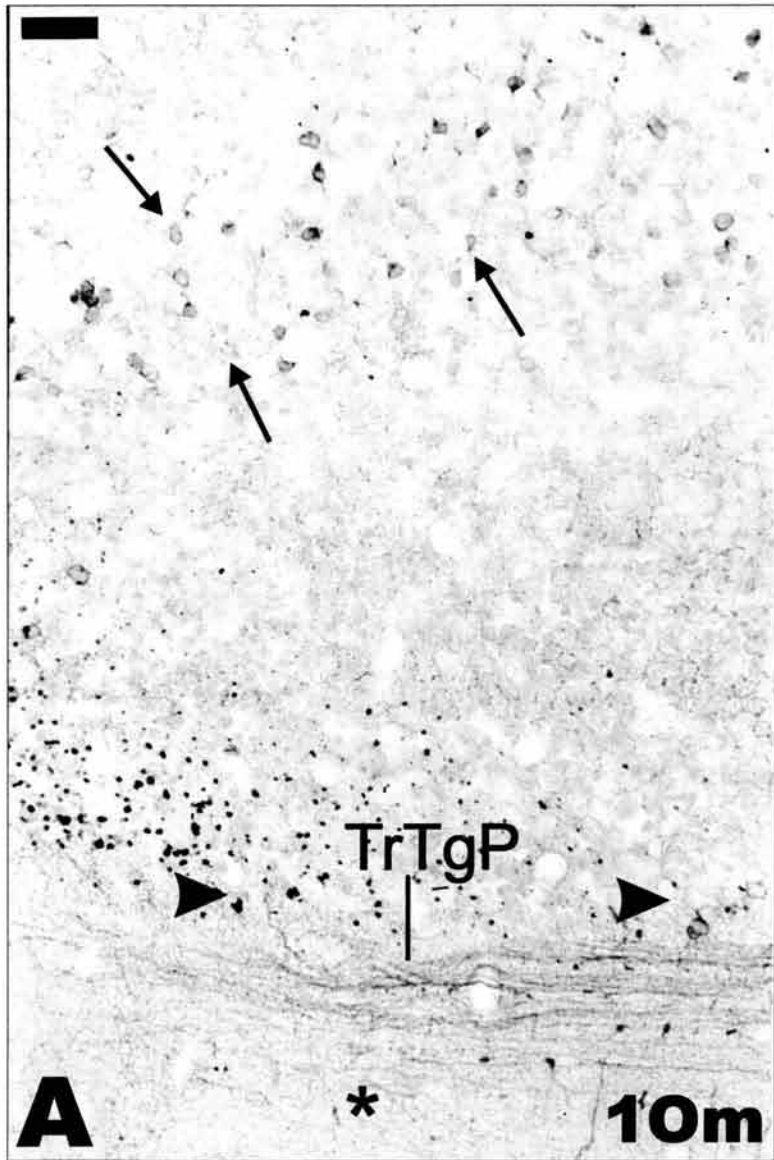


Figura 15. Localización de neuronas (↑) y fibras (✱) positiva a la NADPH-d (A,C) e inmunorreactividad a la nNOS (B) en fotomicrografías de cortes coronales a nivel del **núcleo del nervio oculomotor (NIII)** en los días 30, 60 y 90. Nótese el incremento del numero de neuronas y la intensidad de la marca del día 30 al 90. **Barras:** 16 μm.

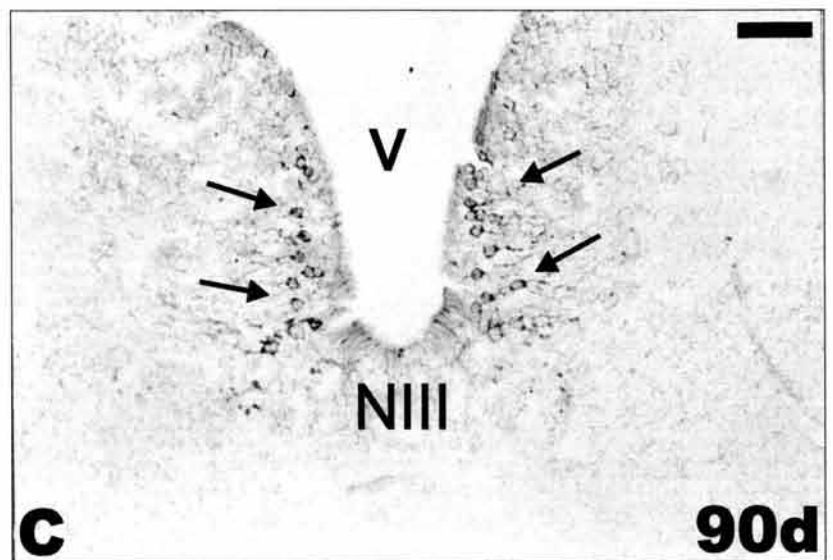
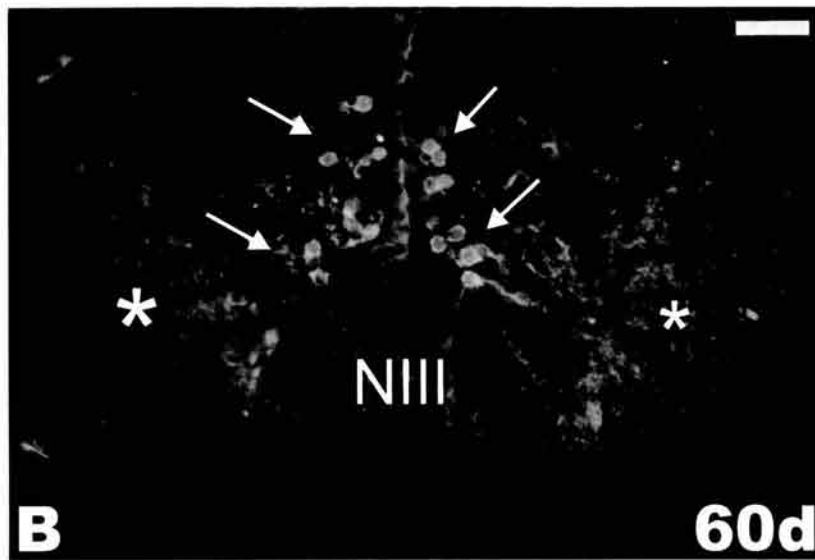
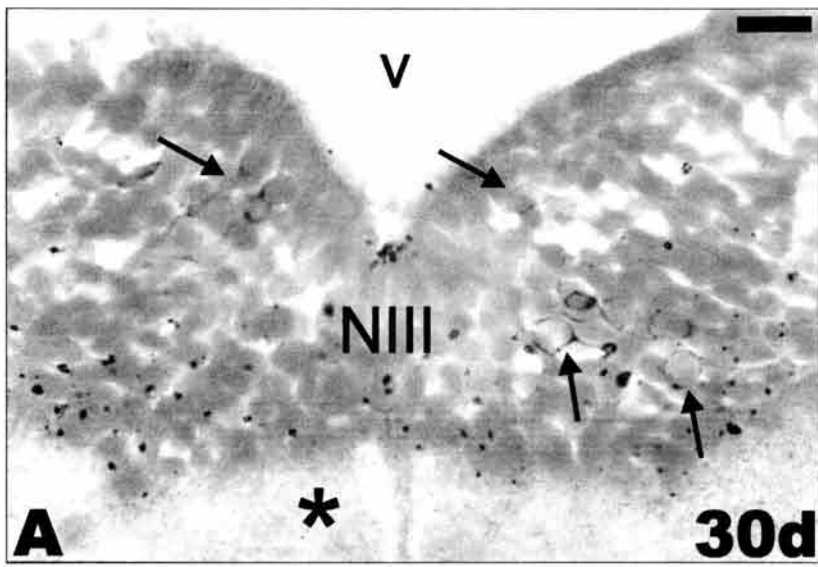


Figura 16. Localización de neuronas (↑) y fibras (✱) positivas a la NADPH-d (A, B) e inmunorreactividad a la nNOS (C,D,E) en fotomicrografías de cortes corónales del **tegmentum dorsal (TgD)** y **tegmentum istmíco (Tgl)** en los días 14, 16, 18 y 90. También en B-E muestran fibras positivas a la NADPH-d y nNOS en el fascículo tegmental (▲) del Tgl. **Barras:** 40 μm (A,B) y 16 μm (C,D,E).

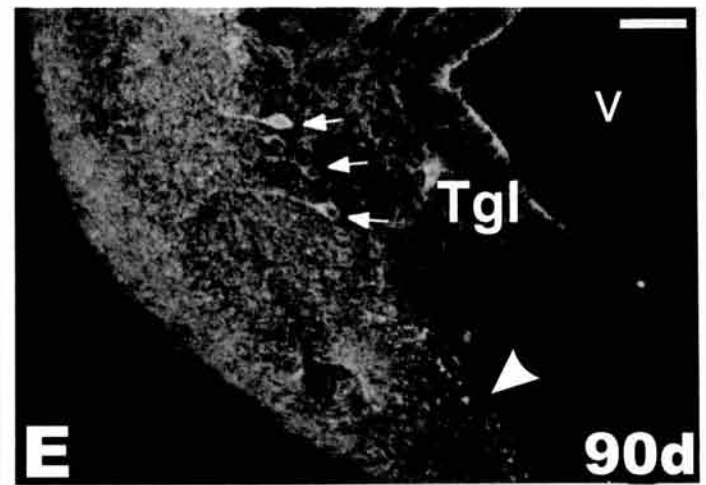
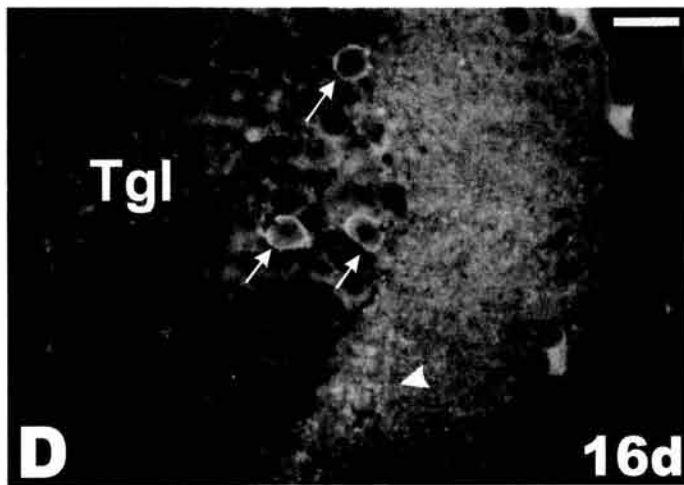
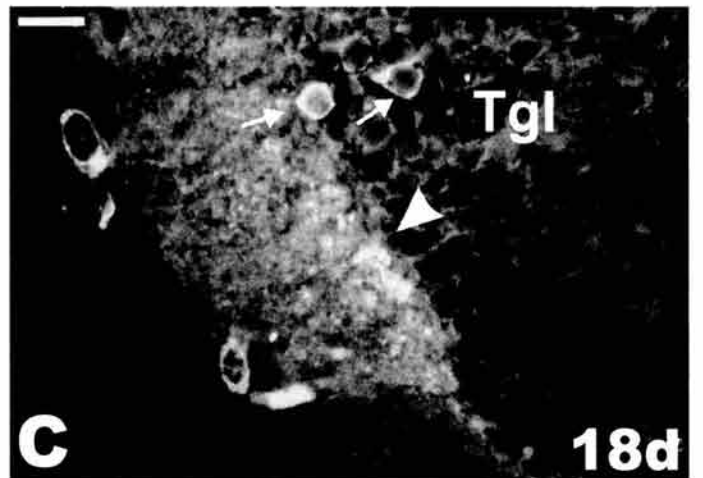
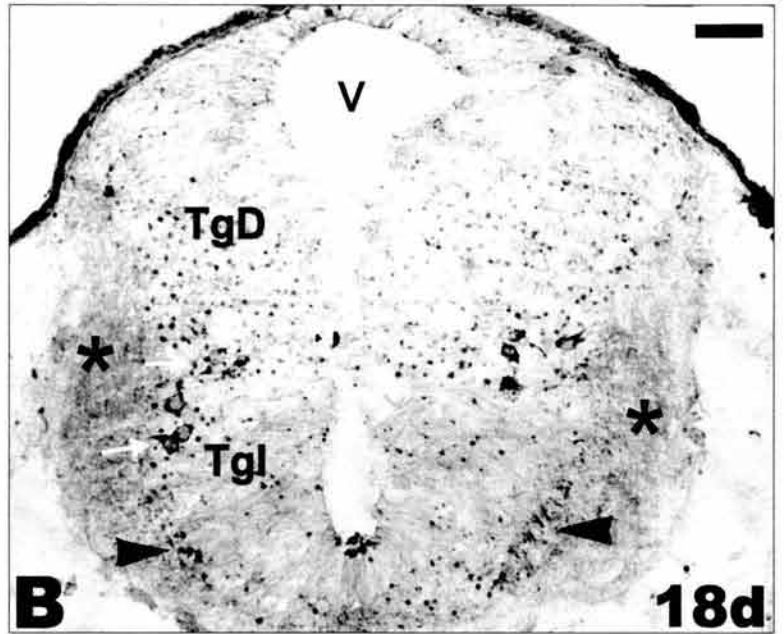
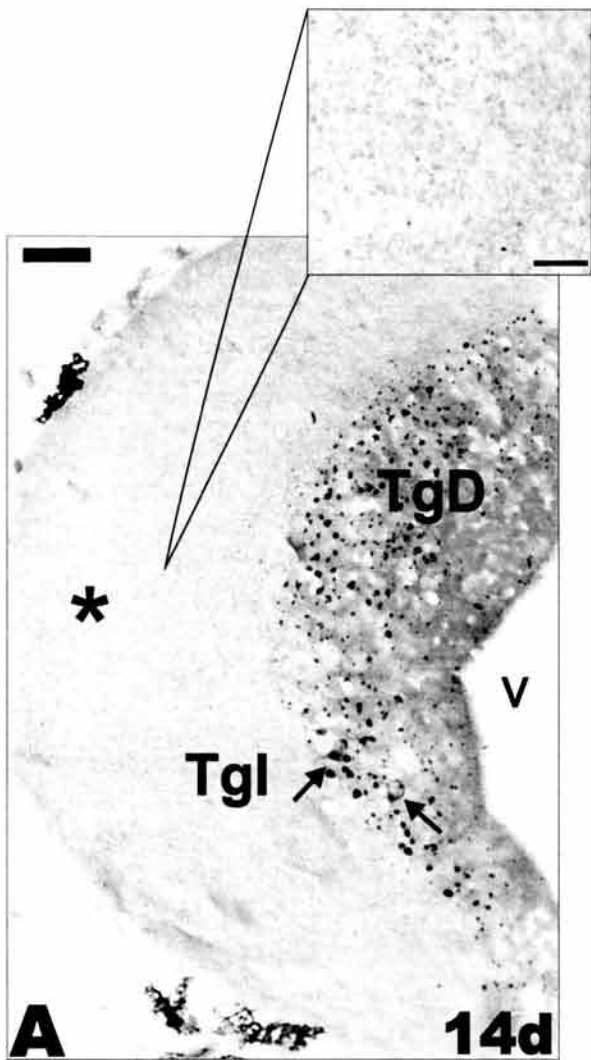


Figura 17. Localización de neuronas (↑) y fibras (✱) positivas a la NADPH-d (A, B, D, E) e inmunorreactividad a la nNOS (C) en fotomicrografías de cortes del **núcleo del fascículo medial telencefálico (NFMT)**, en los días 14, 16, 18 y mes 10. Cortes corónales (A,B,C,D) y parasagitales (E,F). **Barras:** 40 μm (B,E,F), 16 μm (A,C,D).

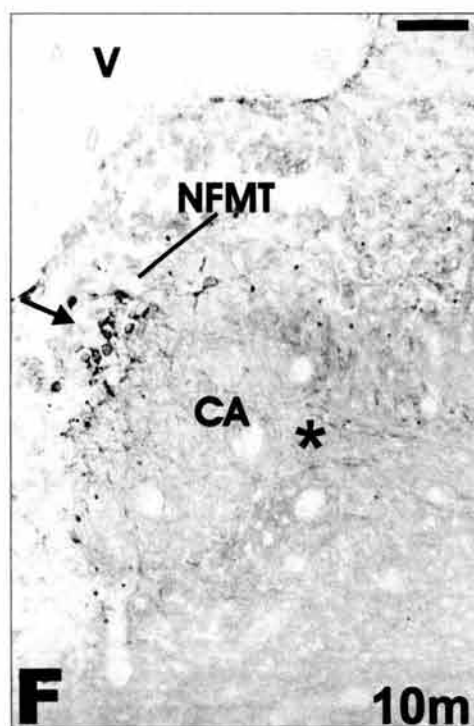
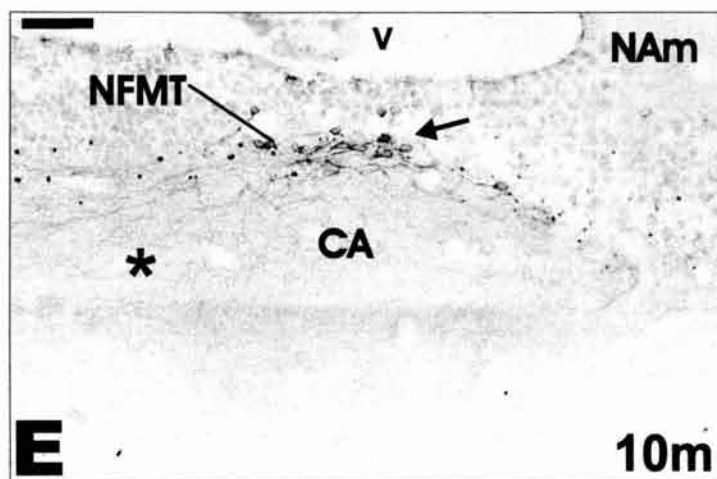
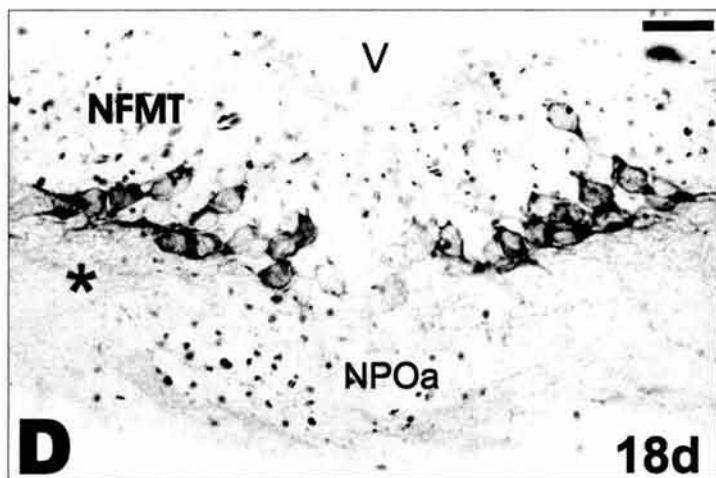
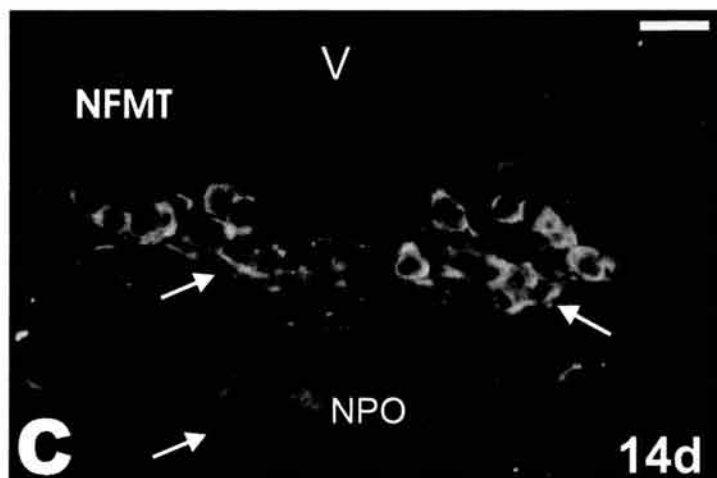
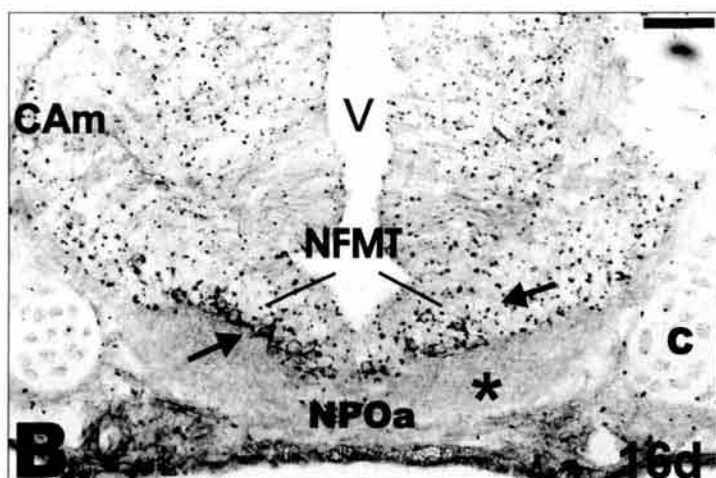
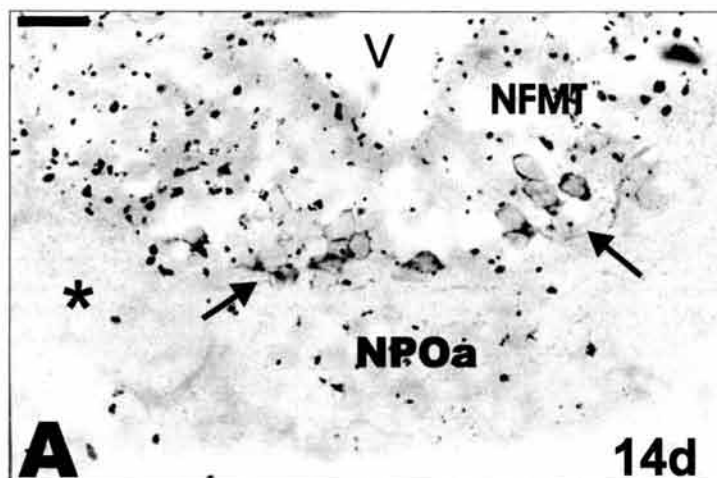
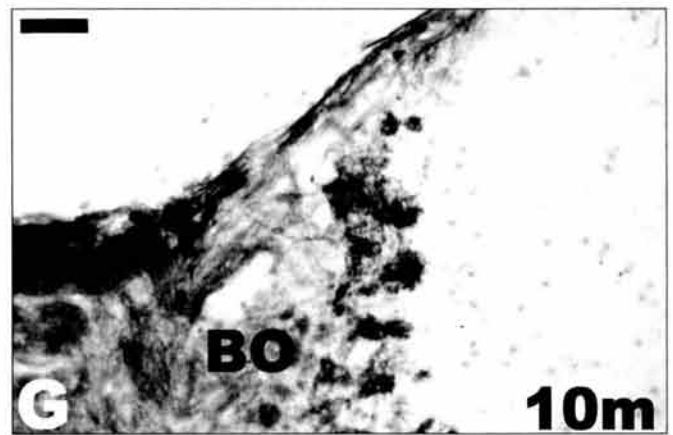
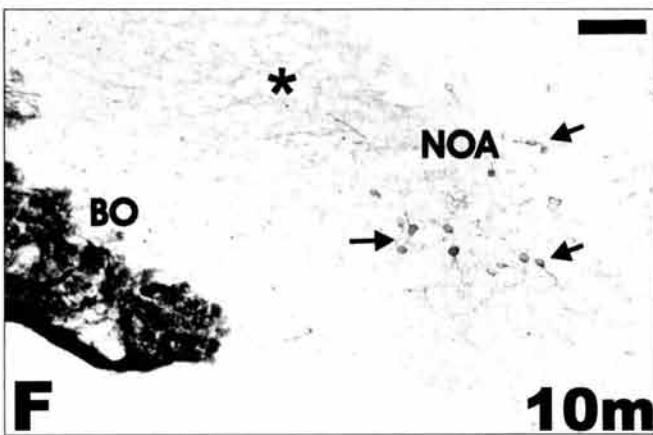
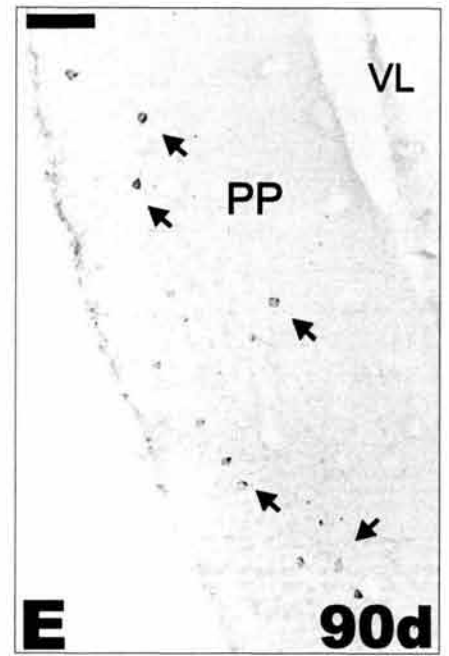
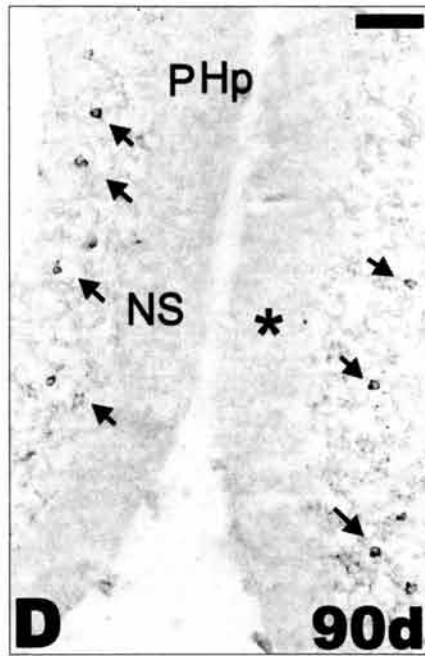
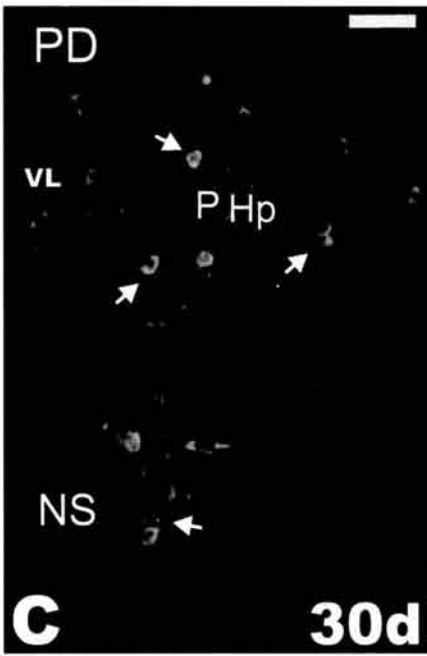
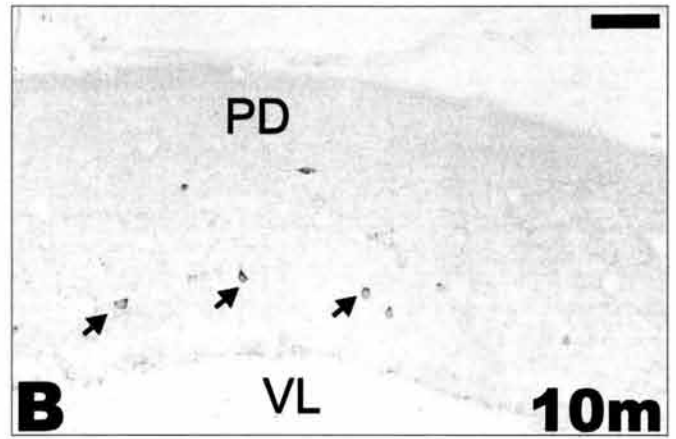
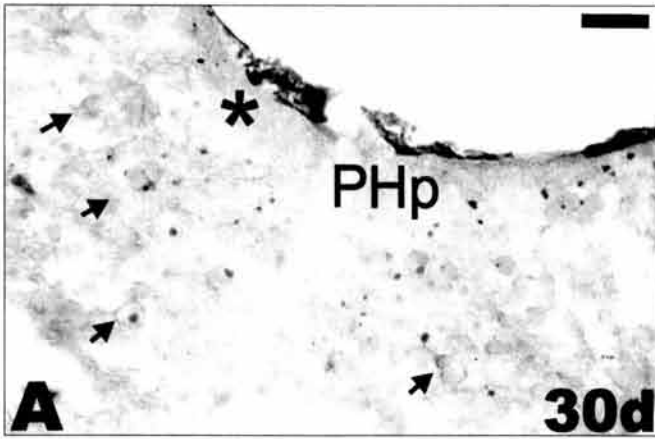


Figura 18. Localización de neuronas (↑) y fibras (✱) positivas a la NADPH-d (A,B,D,E,F,G) e inmunorreactivas a la nNOS (C) en fotomicrografías del **telencéfalo** del axólotl. En **A, C, D** se observan algunas neuronas dispersas con tinción a la NADPH-d (↑) en el palio hipocampal (PHp) y núcleos septales (NS) en los días 30 y 90. **B, E.** Neuronas positivas a la NADPH-d (↑) dispersas en palio piriforme (PP) en el día 90 y en el palio dorsal (PD), en el mes 10. **F.** Grupo de neuronas positivas a la NADPH-d (↑) en el núcleo olfatorio anterior (NOA) en el mes 10. **G.** Fibras del nervio olfatorio positivas a la NADPH-d que inervan al bulbo olfatorio en el mes 10. Estas fibras presentan tinción desde el día 14. **Barras:** 40 μm (B,C,D,E); 16 μm (A, F,G).



CAPITULO II

Estructuras del Sistema Nervioso Periférico Positivas a la NADPH-d y a la nNOS

En los embriones y larvas de la edad de 8 a 30 días, donde se proceso toda la cabeza del animal para las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica, se observaron estructuras correspondientes al sistema nerviosos periférico: los neuromastos (órganos de la línea lateral) y el epitelio nasal. Ambas estructuras presentaron una marca fuerte por lo que nos interesó estudiarlos y describirlos.

Neuromastos

El sistema de la línea lateral del axólotl lo forman tres clases de órganos sensoriales morfológicamente distintos: los neuromastos, los órganos en hoyo (pit) y los órganos ampulares. Los tres tipos de órganos poseen células ciliadas rodeadas por células de soporte. Los neuromastos y los órganos en hoyo funcionan como mecanorreceptores, sensibles a bajas frecuencias en el agua, mientras que los órganos ampulares son electroreceptores. En la figura 19 se muestra la distribución que presentan estos receptores en la cabeza de un axolotl juvenil (Northcutt, 1992). Los neuromastos son los órganos más abundantes en la línea lateral del axolotl. Cada neuromasto está constituido por un conjunto de células situado entre las epidérmicas, las cuales están en contacto con la lámina basal, y lo forman tres tipos celulares: las células de sostén, las sensitivas (con un largo y único kinocilio) y la del manto, también son de sostén pero se sitúan en la periferia.

Los neuromastos presentaron actividad a la NADPH-d, desde el día 8 del desarrollo (Fig. 20 A). En estas estructuras la actividad a la NADPH-d se localizó en las células ciliadas con una mayor intensidad en el área ciliar. A partir de los 10 meses de edad, se encontró inmunorreactividad a la nNOS con una distribución similar a la NADPH-d (Fig. 20 E-G).

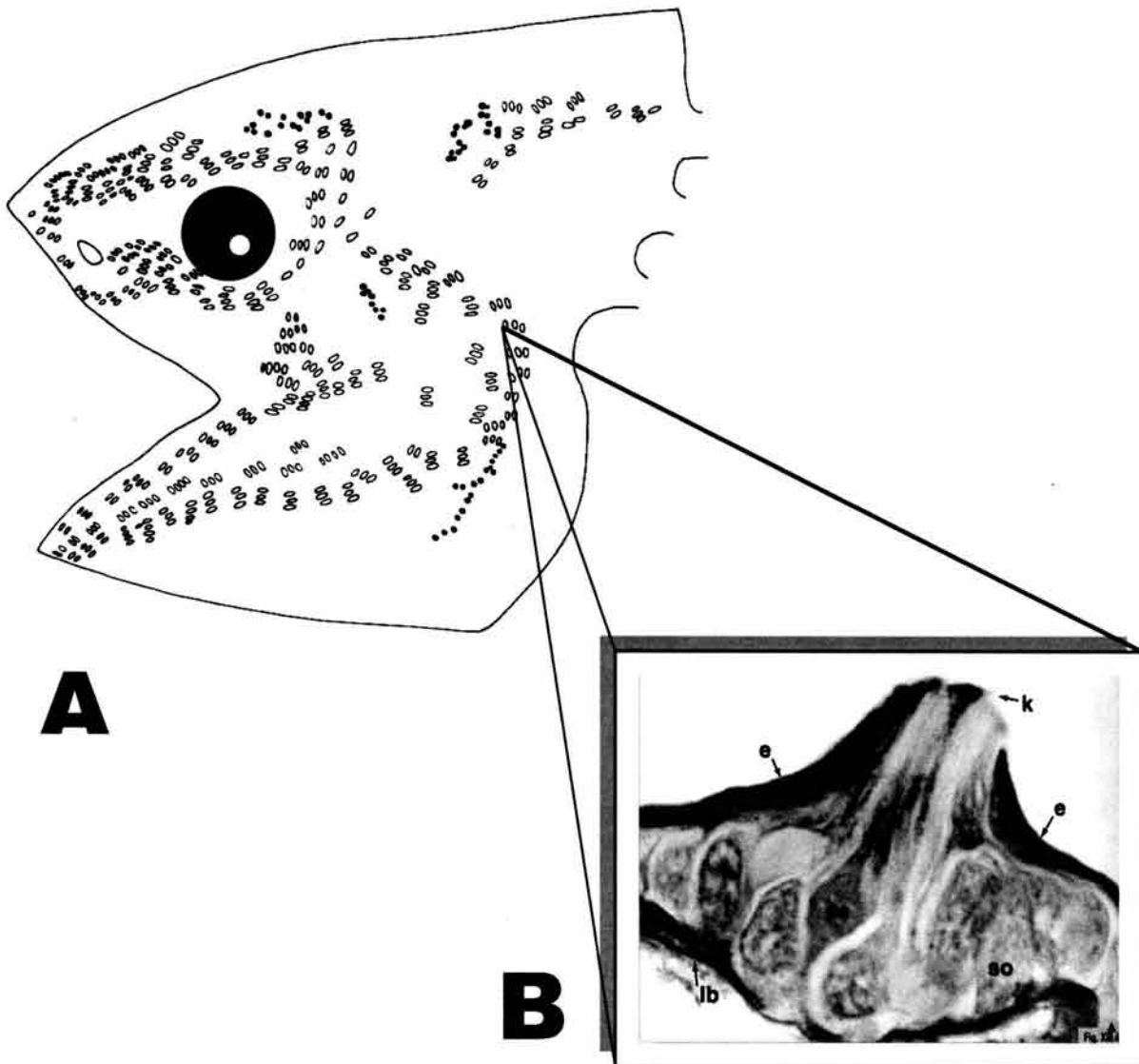
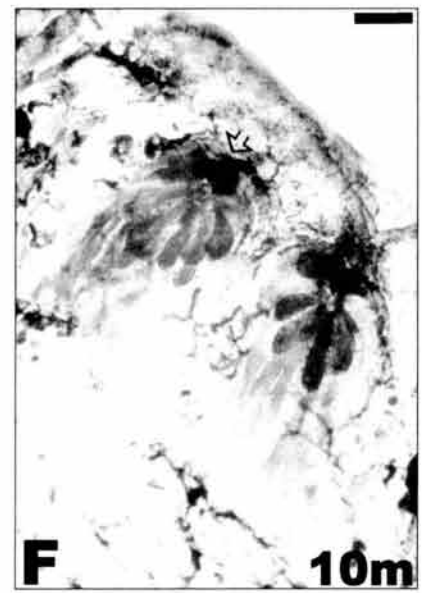
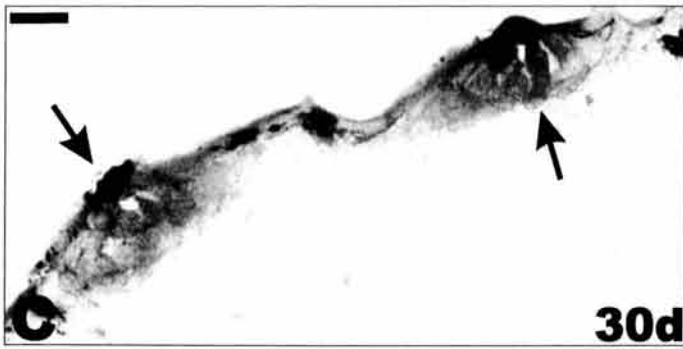
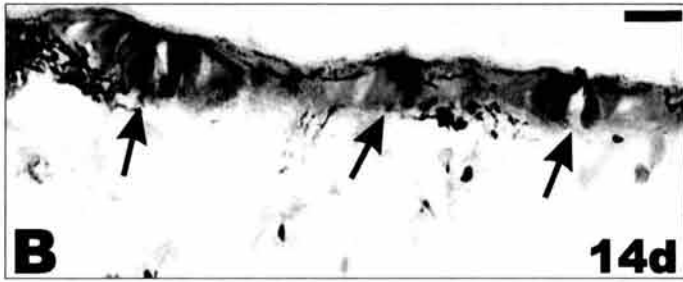
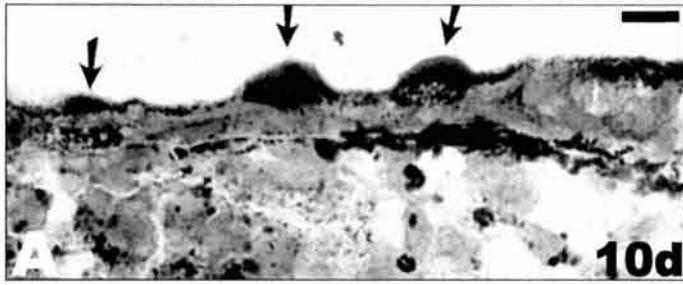


Figura 19. Distribución de los receptores de la línea lateral de la cabeza de axolotl juvenil. **(A)** Los neuromastos (círculos vacíos) y los órganos en hoyo (círculos llenos). **(B)** Fotomicrografía de un neuromasto de axolotl donde se muestran las células de sostén (so) de forma ovoide o irregular, las células sensoriales (se) son altas; su citoplasma es más denso, con gránulos positivos al azul alciano, el polo apical presenta un kinocilio (k) característico de estos receptores, células epidérmicas (e) y la lamina basal (lb). Teñido con azul de alciano 500X, Esquema tomados de Northcutt, 1992 (A) y fotomicrografía tomada de Flores y Uribe, 2003 (B).

Figura 20. Cortes coronales de la piel de la cabeza del axolotl donde se observan **las células sensoriales (↑)** de los **neuromastos** con actividad a la NADPH-d (A-F) e inmunorreactividad a la nNOS (G) a diferentes días del desarrollo 10, 14, 30, 60 y 10 meses. La presencia de inmunorreactividad a la nNOS únicamente la observamos en el mes 10 con una distribución similar a la NADPH-d. Nótese la tinción fuerte durante todos los días del desarrollo. **Barras:** 40 μm (D-G), 16 μm (A-C).



Epitelio Nasal

El NO se ha propuesto para jugar un papel en el procesamiento de la señal olfatoria basado en los siguientes puntos: a) la localización anatómica de la sintasa del óxido nítrico (NOS) en el sistema olfatorio de invertebrados (Gelperin, 1994; Sánchez-Álvarez et al., 1994; Müller y Hildebrandt, 1995; Talavera et al., 1995; Gelperin et al., 1996; Müller 1996; Bicker, 1998; Colasanti y Venturini 1998; Ott y Burrows, 1999; Gelperin et al., 2000) y vertebrados (Davis, 1991; Breer et al., 1992a; Kishimoto et al., 1993; León-Olea et al., 1994; DellaCorte et al., 1995; Broillet y Firestein, 1996; Hopkins et al., 1996; Porteros et al., 1996; Zielinski et al., 1996, Wenisch et al., 2000); b) La estimulación de las neuronas receptoras olfatorias (NRO) con altas dosis de odorantes y feromonas incrementan los niveles GMPc y este incremento intracelular puede ser inhibido por la L-N^G-nitroarginina, un inhibidor selectivo de la formación del NO (Breer et al., 1992; Breer y Shepherd, 1993; Lischka y Schild, 1993; Inamura et al., 1998; Schmachtenberg y Bacigalupo, 2000) y c) además en el bulbo olfatorio, el NO participa en la formación de la memoria olfatoria vía GMPc (Müller, 1996; Bicker, 1998; Menzel y Muller, 1996; Kendrick et al., 1997).

Los métodos mas usados para revelar la distribución de la NOS en el sistema nervioso son la inmunohistoquímica y la histoquímica enzimática para detectar la actividad de la NADPH-diaforasa (Thomas y Pears, 1961; Vincent, 1986; Vincent y Kimura, 1992; Rodrigo et al., 1994). Actualmente, la NOS y la NADPH-d son consideradas la misma enzima (Dawson et al., 1991; Hope et al., 1991; Bredt y Snyder, 1992; Matsumoto et al., 1993). De este modo, la inmunorreactividad a la NOS neuronal (IR-nNOS) y la tinción a la NADPH-d colocalizan en el sistema nervioso central (Rodrigo et al., 1994; Dawson et al., 1991; Holmqvist, et al., 1994; Brüning et al., 1995; González et al., 1996; Smeets et al., 1997). Sin embargo, hay algunas regiones cerebrales donde no se ha demostrado la colocalización, como son el sistema olfatorio (Holmqvist et al., 1994; Brüning et al., 1994; Kulkarni et al., 1994; Brüning et al., 1995; Brüning et al., 1996; Porteros et al., 1996). Esta falta de colocalización se observa en el epitelio olfatorio de varias especies de vertebrados (ver Tabla VII).

Una revisión cuidadosa de los estudios reportados reveló que no hay colocalización de la tinción a la NADPH-d y la IR-NOS en las NRO de animales adultos. Sin embargo, en estados tempranos del desarrollo y durante la reconstitución del epitelio nasal después de una axotomía o una bulbotomía olfatoria, si colocalizan (Sánchez-Islas et al., 2001; Roskams et al., 1994). Como es el caso de la larva premetamórfica de la lamprea, *Petromyson marinus* (Zielinski et al., 1996).

Así, parece que la colocalización de ambas marcas (nNOS y NADPH-d) se ve únicamente durante el proceso del desarrollo del sistema olfatorio.

TABLA VII. Localización de la marca a la nNOS y a la NADPH-d en el epitelio nasal de diferentes vertebrados

Animal	Estructuras						Refs.				
	NRO-EO		NRO-OV		FN	GB-CS		GB-FN	VS-FN		
	NOS/ ND	NOS/ ND	NOS/ ND	NOS/ ND	NOS/ ND	NOS/ ND		NOS/ ND			
Humano	-	+	-	+	-	+	-	o	+	+	158 242 237
	-	o	-	o	-	o	-	o	-	o	
	o	o	-	-	+	+	o	o	-	+	
Rata	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	62
	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	158
	o	+	o	+	o	-	o	-	o	-	115
	o	-	o	+	o	+	o	+	o	+	116
Ratón	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	144
	-	o	-	o	+	o	-	o	+	o	152 242
Rana (<i>Rana perezii</i>)	o	o	o	o	-	-	o	o	o	o	229
Salamandra (<i>Triturus marmoratus</i>)	o	o	o	o	-	+	o	o	o	o	
Axolotl (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	248
Catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	o	+	NA		o	-	NA	NA	o	-	229
Lamprea (<i>Petromyzon marinus</i>)	+	+	NA		o	-	NA	NA	o	-	204

Abreviaciones: GB-FN, fibras nerviosas alrededor de las glándulas de Bowman; BV-NF, fibras nerviosas alrededor de los vasos sanguíneos; GB-CS, células secretoras de las glándulas de Bowman; NA, no aplica; FN, fibras nerviosas; NRO-EO, neuronas receptoras olfatorias en el epitelio olfatorio; NRO-OV, neuronas receptoras olfatorias en el órgano vomeronasal. (+) Positiva o (-) negativa inmunoreactividad a la nNOS (NOS) y/o tinción a la NADPH-d (ND), (o) no reportada.

Sistema Olfatorio del Axolotl

El sistema olfatorio del axolotl está formado por tres tipos celulares característicos: células sustentaculares, células basales y las NRO (Eisthen et al., 1994). Las NRO reciben las señales olfatorias, la transducen y la transmiten al bulbo olfatorio. Estas neuronas consisten de un soma elongado, un axón delgado y una dendrita larga. El axón emerge de la región inferior del soma y entra al nervio olfatorio. La dendrita se dirige apicalmente hacia la superficie del epitelio y terminan en un botón apical en el cual hay cilios y microvellocidades, formando un complejo mucociliar/microvililar. Las células sustentaculares se asocian con la regulación de la composición de la capa mucosa (Getchell et al., 1984). Las células basales se sabe que dan origen a las

nuevas NRO (Graziadei y Graziadei, 1976; Caggiano et al., 1994). Finalmente, el órgano vomeronasal del axolotl se localiza en el diverticulum que esta conectado a la pared lateral de la cavidad nasal. Esta formado por un epitelio olfatorio (EO) con los tres tipos celulares mencionados, los axones de sus NRO también entran al nervio olfatorio y terminan en el bulbo olfatorio accesorio. El órgano vomeronasal carece de glándulas de Bowman (Eisthen et al., 1994) (Fig. 21).

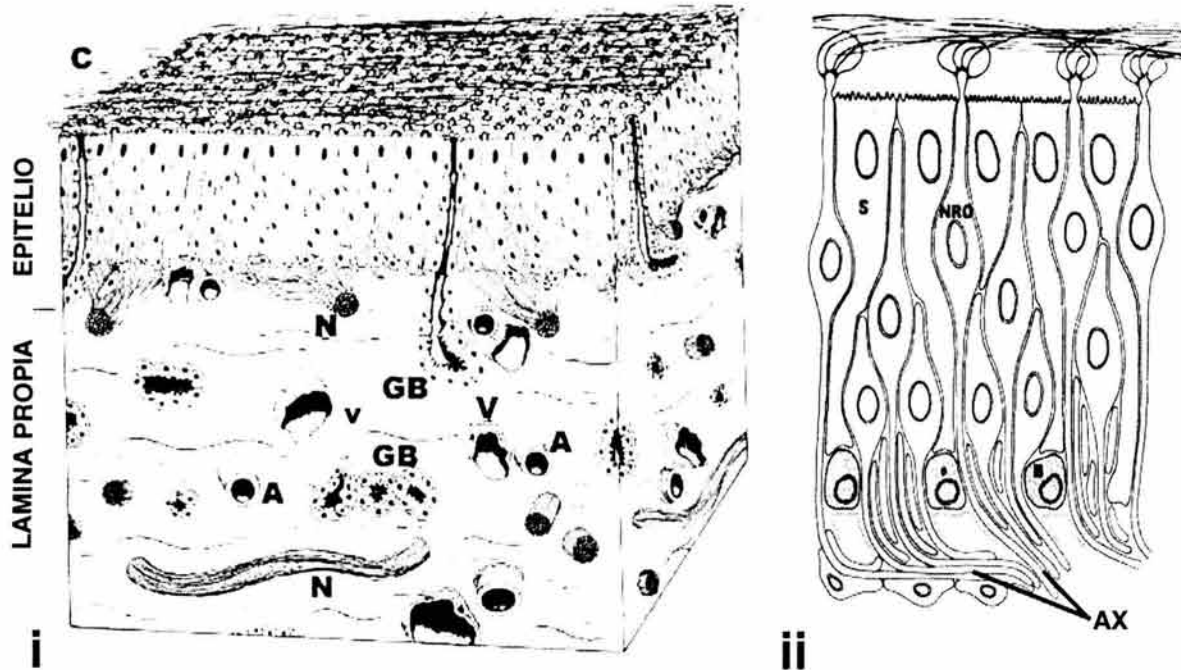


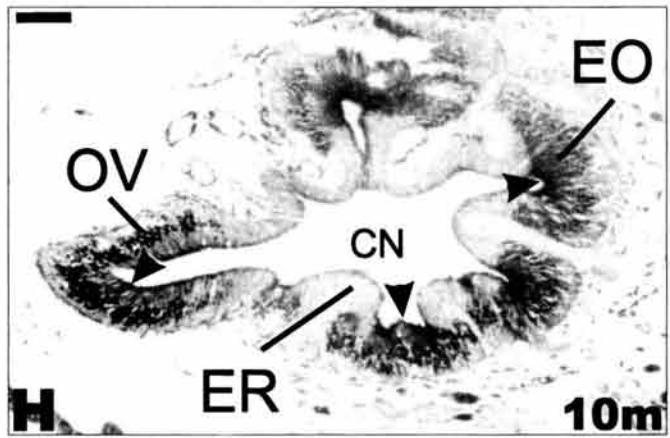
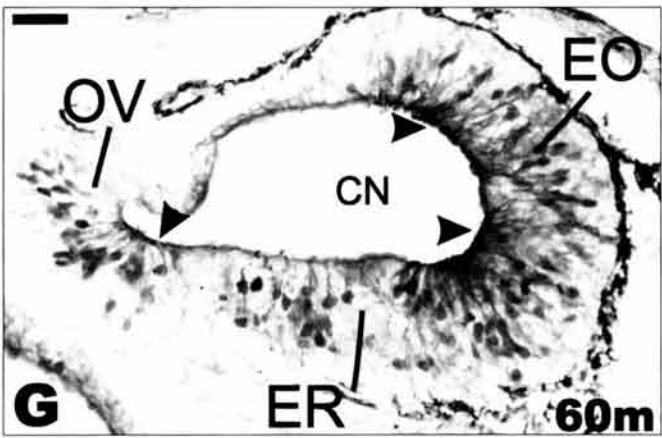
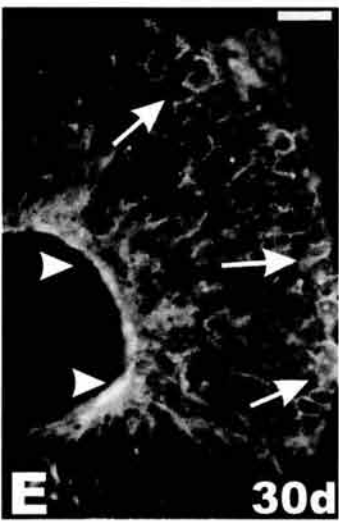
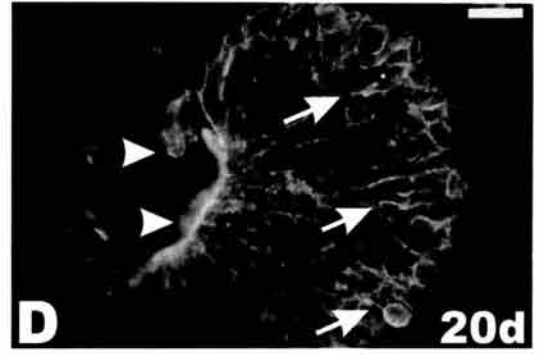
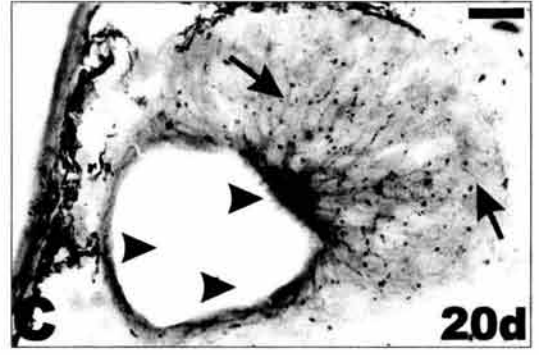
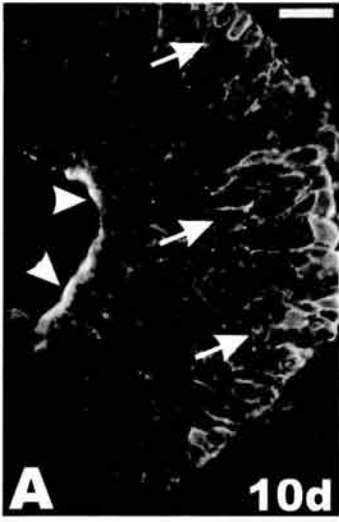
Figura 21. Diagrama de la mucosa olfatoria (i) donde se muestra el epitelio y la lamina propia. En la superficie del epitelio, los cilios (c) cubiertos con una capa de moco y quedan paralelos a la superficie. Dentro de la lamina propia están las glándulas de Bowman (BG), los ases de fibras nerviosas olfatorias (N), y los vasos sanguíneos (arterias pequeñas (A) y venas (v)). Los conductos de las glándulas de Bowman abren en la superficie. (ii) Diagrama de una sección del epitelio olfatorio donde se muestran las células basales (B) localizadas en la parte inferior del epitelio, las neuronas receptoras olfatorias (NRO) con sus dendritas con complejos mucociliar/mucovilliar en la punta, miran hacia la superficie del epitelio y en la parte inferior están sus axones (AX). Las células sustentaculares (S) presentan en la punta microvellosidades. Esquemas tomados de Farbman A, 1992.

Distribución de la NADPH-d y la nNOS Durante el Desarrollo del Epitelio Nasal

Durante el desarrollo del epitelio nasal a partir del día 10 se encontró actividad a la NADPH-d e inmunorreactividad a la nNOS (Fig. 22 A, B). En este día, el complejo microciliar presentó una marca fuerte, mientras que en las NRO se observó una tinción leve a la NADPH-d. En las células basales se observó una inmunorreactividad fuerte a la nNOS. En el día 16 el nervio olfatorio mostró

una tinción fuerte a la NADPH-d. El patrón de distribución anatómica de las NRO, desde el día 10 hasta el día 30, no cambia solo hay un aumento en la intensidad de la marca (Fig. 22). En el día 40, aumenta el número de neuronas con actividad a la NADPH-d. La IR-nNOS se localizó en el complejo mucociliar/microviliar en las dendritas y con menor intensidad en las NROs. Después del décimo mes (10m) del desarrollo, la marca es mas evidente y definida (Fig. 22 H). A partir del día 50 se observó actividad a la NADPH-d en las NRO del epitelio del vomeronasal hasta la etapa de adulto. En los experimentos de inmunohistoquímica para la nNOS, a las concentraciones utilizadas para el cerebro (1:500), el epitelio nasal no presentó inmunorreactividad. En larvas de 10 meses se aumento la concentración (1:100) y se observó la misma distribución que la NADPH-d.

Figura 22. Localización de la actividad a la NADPH-d (B, C, E, G, H) e inmunorreactividad a la nNOS (A, D, F) en cortes coronales del **epitelio nasal** del axolotl a diferentes días del desarrollo. **A-D.** A los 10 y 20d, células basales positivas (↑) localizadas en la parte basal del epitelio olfatorio. **E, F.** A los 30d, células basales positivas (flechas blancas) y neuronas receptoras olfatorias (NROs) jóvenes con una marca tenue (flechas negras). **G, H.** A los 60d y 10 meses, una marca fuerte en las NROs (↑) del epitelio olfatorio de la cavidad nasal (CN) y del órgano vomeronasal (OV). La parte apical de las dendritas de las NROs donde se localizan los complejos mucociliar/mucoviliar (▲) presentaron una marca fuerte durante todo el desarrollo. **Barras:** 170 μm (H), 40μm (C,D,G), 16 μm (A,B).



Del estudio ontogenético de la distribución de la NOS en el epitelio olfatorio derivó el siguiente trabajo, el cual se presenta resumido, para mas detalles ver el sobretiro anexo: Sánchez-Islas E., León-Olea M. Histochemical and immunohistochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the olfactory epithelium of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Nitric Oxide*. 5:302-16, 2001.

El propósito de este estudio fue describir la distribución anatómica de la IR-nNOS y la tinción histoquímica de la NADPH-d en el epitelio olfatorio del axolotl *A. mexicanum*. Varios grupos de investigación han descrito una fuerte actividad enzimática de la NADPH-d e IR-nNOS en el epitelio nasal de vertebrados. Por lo que se ha sugerido un importante papel del NO en la transducción de la señal olfatoria en el epitelio nasal. Existe una controversia en cuanto a la colocalización de la marca histoquímica e inmunohistoquímica en la etapa de adulto. La tinción a la NADPH-d y la IR-nNOS colocalizan en el cerebro de los vertebrados adultos y en etapas embrionarias o cuando hay un daño nervioso. Por lo que existe la duda si es realmente la nNOS o alguna otra enzima diaforásica la que esta en el epitelio olfatorio. El axolotl es un anfibio neoténico, término que indica que llega a su madurez sexual y se reproduce conservando las características juveniles, o sea no sufre metamorfosis.

Objetivo General

- Realizar un estudio de la distribución anatómica del óxido nítrico en el epitelio nasal del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, en la etapa juvenil y en la del adulto neoténico.

Objetivos Específicos

-Conocer la existencia y localización del óxido nítrico en el epitelio olfatorio del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, en la etapa juvenil y en la del adulto neoténico, mediante la utilización de la técnica histoquímica para la NADPH-d y la inmunohistoquímica para la nNOS.

-Comparar la distribución de la tinción a la NADPH-d y la inmunorreactividad a la nNOS, en el epitelio olfatorio del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, en la etapa juvenil y en la del adulto neoténico, con el fin de corroborar su colocalización.

-Corroborar que las NRO tengan actividad enzimática para la NADPH-d e inmunorreactividad a la nNOS del epitelio olfatorio del axolotl, *Ambystoma mexicanum*, mediante la realización de una axotomía unilateral olfatoria.

Materiales y Método

Para este estudio se utilizaron once axolotls adultos neoténicos (25-30 cm de largo y 85 a 110 g de peso, sexualmente maduros) y 8 axolotls juveniles de 10 meses de edad (13-15 cm de largo y 40 a 60 g de peso, sexualmente inmaduros). Los juveniles se obtuvieron de nuestra colonia. Todos los animales se mantuvieron en un condiciones de laboratorio hasta su utilización en los experimentos como se explica en materiales y métodos del capítulo I.

Perfusión y obtención del tejido nasal

Los axolotls se anestesiaron y se perfundieron como se describe en el apartado de los materiales y métodos del capítulo I (ver pág. 22).

El área nasal se postfijó por inmersión en la misma solución fijadora por 4 h a 4 °C. Los tejidos se almacenaron en sacarosa al 30 % en PB (4 °C, 24 h). Posteriormente, se realizaron cortes corónales y parasagitales de 15-20 μm con un crióstato a -18°C y se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados. Los cortes se secaron y se almacenaron a 4 °C por 24 h hasta su procesamiento.

Se verificó que la mucosa olfatoria estuviera sana por medio de la técnica de hematoxilina eosina.

Histoquímica para la NADPH-diaforasa e inmunofluorescencia para la NOS

Se usaron cortes seriados alternados, unos para la histoquímica para la NADPH-d y otros para la inmunohistoquímica de la NOS. Las técnicas se realizaron como se describe en el apartado de los materiales y métodos del capítulo I (ver págs. 20-21).

Axotomía olfatoria

La bulbetomía y la axotomía olfatoria inducen degeneración de las NRO (Graziadei y DeHan, 1973; Graziadei y Graziadei, 1979; Graziadei y Okano, 1979; Graziadei et al., 1980; Graziadei y Monti Graziadei 1980; Wang y Halpern 1982; Doucette et al., 1983), por lo que se utilizó la axotomía para confirmar que la tinción a la NADPH-d y la IR-NOS se localizaba en las NRO. Se practico a 14 axolotls (8 adultos neoténicos y 6 juveniles) una axotomía unilateral olfatoria. Los animales previamente anestesiados se les hizo una incisión en el área nasal para remover el cartílago craneal. El nervio olfatorio se expuso y se cortó en la proximidad al bulbo olfatorio. Un trozo pequeño (5 mm) de Gelfoam (Upjohn, Co.) se introdujo parar prevenir el sangrado y la reinervación, por ultimo la piel se suturo (Fig. 23). Los animales se recuperaron de la anestesia y cirugia en un acuario y se sacrificaron a las 2 y 5 semanas posteriores a la axotomía. El área nasal se proceso usando los mismos procedimientos histoquímicos e inmunohistoquímicos. El lado contralateral no axotomizado se uso como control.

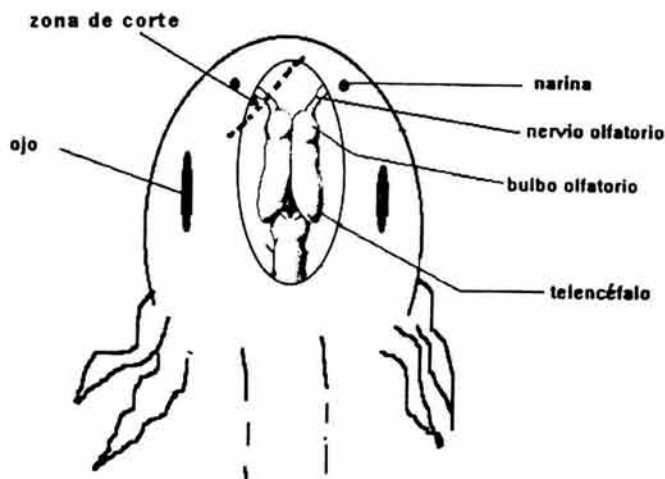


Figura 23. Esquema de la cabeza del axolotl, *A. mexicanum*, donde se muestra el cerebro y el nervio olfatorio, parte donde se realizo la axotomía unilateral olfatoria (zona de corte).

Resultados

Los animales mantenidos bajo condiciones del laboratorio fueron saludables y presentaron un epitelio olfatorio libre de infecciones nasales como se confirmo con el análisis histológico (Fig. 24 A-C). Los resultados mostraron una marca intensa a la NADPH-d e IR-nNOS en las dendritas y en los somas de las NRO de la cavidad nasal y del órgano vomeronasal del axolotl (Fig. 25 A-G,

Fig. 26 A-E). La marca también se encontró en las fibras nerviosas que rodean las arteriolas, en las células secretoras y en las del conducto de las glándulas de Bowman (Fig. 25 E-G; Fig. 26 E).

En los animales axotomizados con 2 semanas de sobrevivencia, se observó una disminución importante de la tinción a la NADPH-d e IR-nNOS. Las células basales se mantuvieron con marca y aumentaron en número (Fig. 28 A, Fig. 29 A-B). A las 5 semanas después de la axotomía, la tinción en el soma de las NRO desaparece completamente. Únicamente, una tinción ligera se observa en las dendritas de las NRO (Figs. 28 B y C). La tinción a la NADPH-d en el complejo mucociliar/microviliar de la cavidad principal tuvo un pequeño decremento y el del órgano vomeronasal no cambió (Fig. 28D). En los ases de fibras nerviosas también se observó un decremento de la tinción a la NADPH-d. El epitelio olfatorio y el órgano vomeronasal, contralateral a la lesión (control), exhiben la misma distribución de la tinción a la NADPH-d que se observa en los animales que no fueron axotomizados. Los resultados obtenidos confirman que la tinción a la NADPH-d e IR-nNOS estaba en las NRO.

Así, los presente resultados sugieren que el NO puede estar involucrado en varias funciones fisiológicas en la cavidad nasal del *Ambystoma mexicanum*. Estas funciones parecen incluir la transducción de la señal olfatoria, regulación del flujo sanguíneo, y modulación de la secreción de las glándulas de Bowman. Además, el NO parece jugar un papel en el desarrollo de las NRO, ya que las células basales dan origen a las NRO y se marcaron fuertemente después de la axotomía .

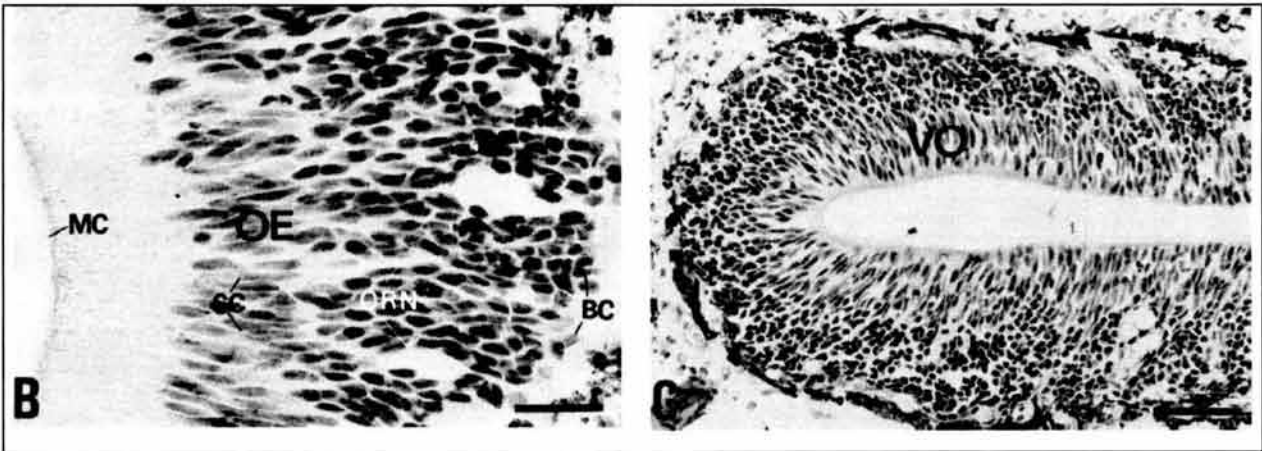
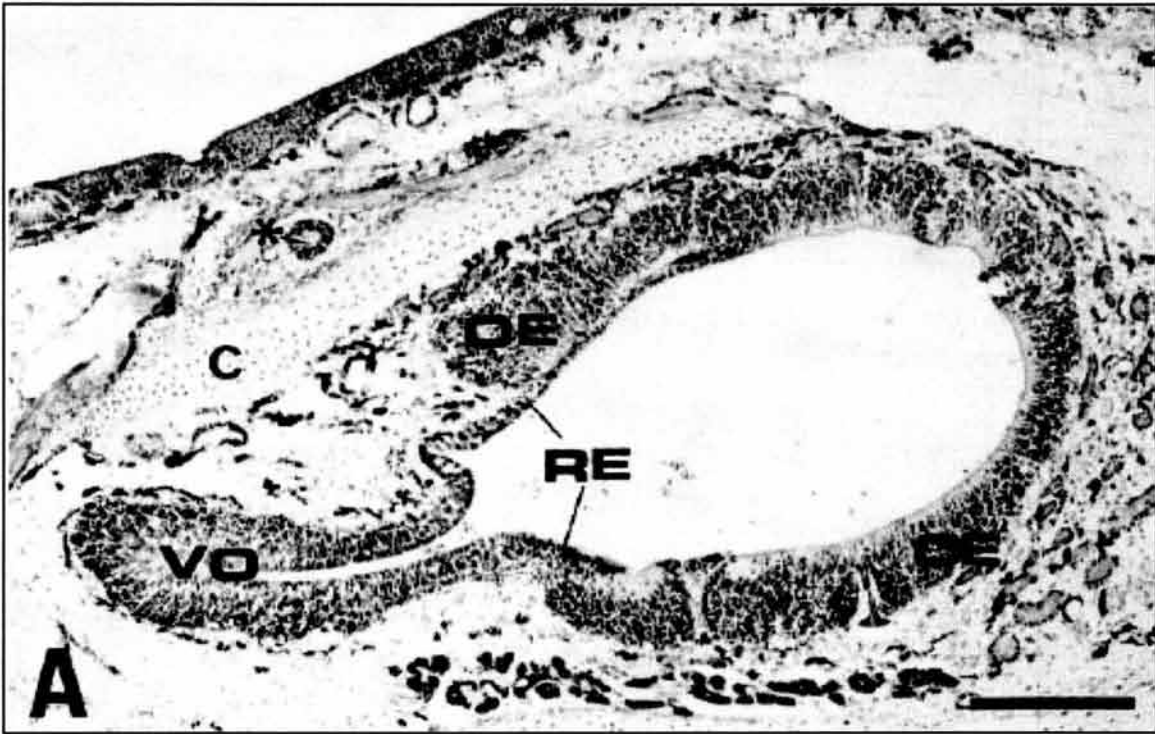


Figura 24. Fotomicrografía de un corte coronal de 20 μm de grosor de la cavidad nasal del axolotl adulto, teñida con hematoxilina-eosina (H-E). La parte medial esta a la derecha. **(A)** Este corte ilustra la región del divertículo lateral, el cual esta cerca del epitelio del órgano vomeronasal (VO), que se conecta con la cámara principal de la cavidad nasal que esta limitada con secciones de epitelio olfatorio (OE) y respiratorio (RE). El conducto nasolacrimal (asterisco) se observa cerca del cartilago (c) dorsolateral a la cavidad nasal. **(B)** epitelio olfatorio de la porción media de la cavidad nasal. El epitelio tiene células sustentaculares (SC), neuronas receptoras olfatorias (ORN), células basales (BC). En el lado izquierdo de la fotomicrografía se pueden observar los complejos mucociliar/microviliari (MC). **(C)** el epitelio olfatorio del órgano vomeronasal presenta los tres tipos de células y sus complejos mucociliar/microviliari. **Barra:** 50 μm (B), y 120 μm (C), 500 μm (A).

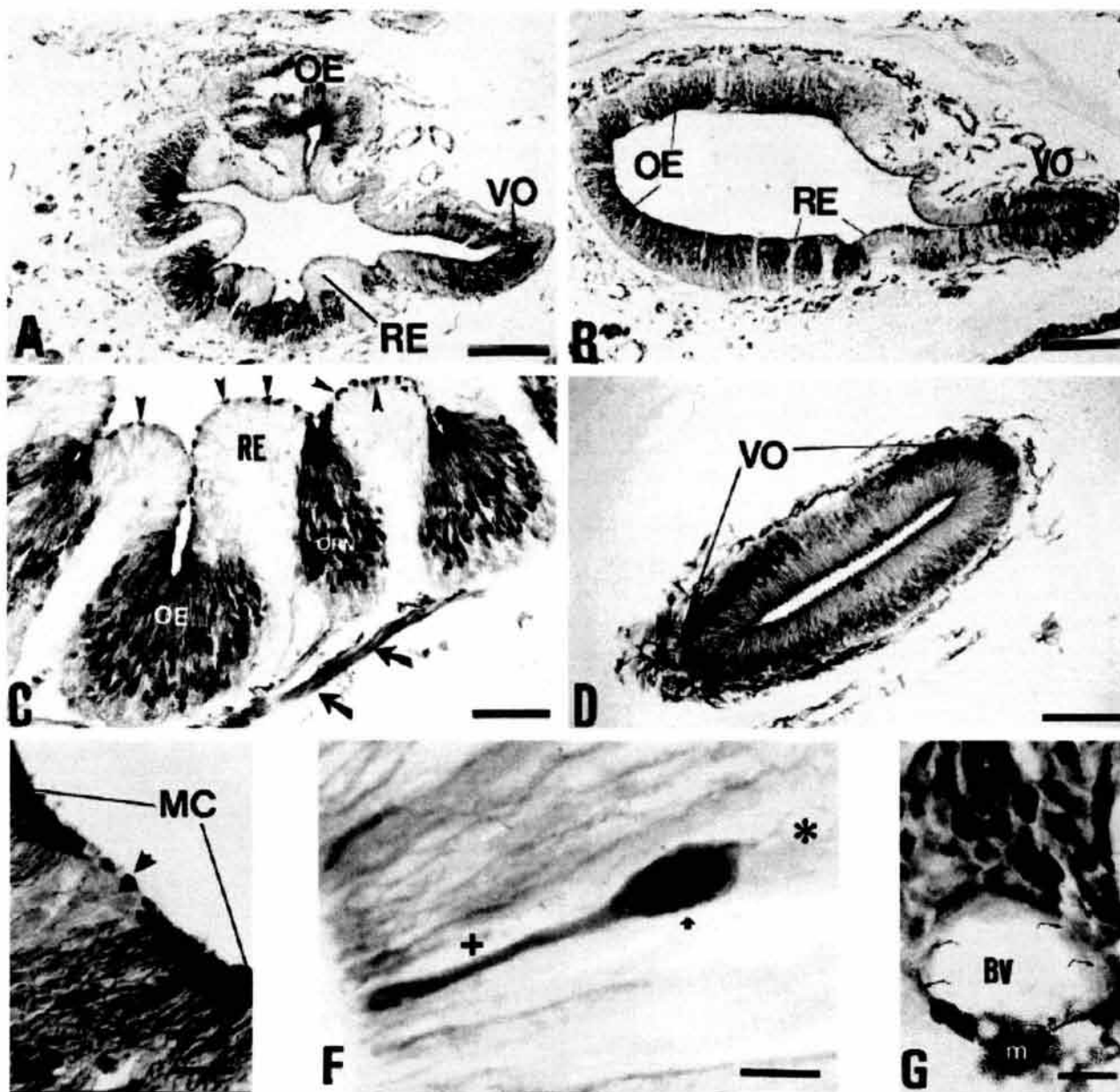


Figura 25. Localización de la actividad a la NADPH-d en la cavidad nasal del *A. mexicanum*. Vista panorámica de cortes coronales de axolotls juvenil (A) y adulto neoténico (B). La parte medial de la cavidad esta a la derecha de ambas secciones. En el axolotl juvenil (A) el epitelio respiratorio (RE) esta en las crestas y el epitelio olfatorio (OE) en los surcos comparado con la superficie lisa del epitelio del adulto neoténico (B), que esta limitado por pequeñas secciones de RE y OE. La tinción intensa a la NADPH-d se observa en las neuronas receptoras olfatorias (ORN) en la cámara principal y en el órgano vomeronasal (VO) en ambos cortes. (C) fotomicrografías del OE con tinción a la NADPH-d en las ORN, en los ases de fibras nerviosas (flechas), y en las células de la superficie del ER (cabeza de flecha). (D) tinción a la NADPH-d en las ORN y en los complejos mucociliares/microviliares (MC, flechas pequeñas) del OV. (E) tinción intensa a la NADPH-d en las dendritas y MC del OE y las células teñidas de la superficie del RE (cabeza de flecha). (F) alta magnificación de una ORN de la cámara principal mostrando una intensa tinción en la dendritas (+), el axón (*), y en el soma (flecha pequeña). (G) tinción a la NADPH-d en las fibras nerviosas (flechas curvas) alrededor de los vasos sanguíneos (BV) localizadas en la lamina propia del OE. Nótese la presencia de melanocitos (m) a un lado de los BV. Todas las secciones fueron contrateñidas con safranina. Barra: 10 μ m (F), 50 μ m (C), 100 μ m (E y G), 120 μ m (D), 250 μ m (A) y 500 μ m (B).

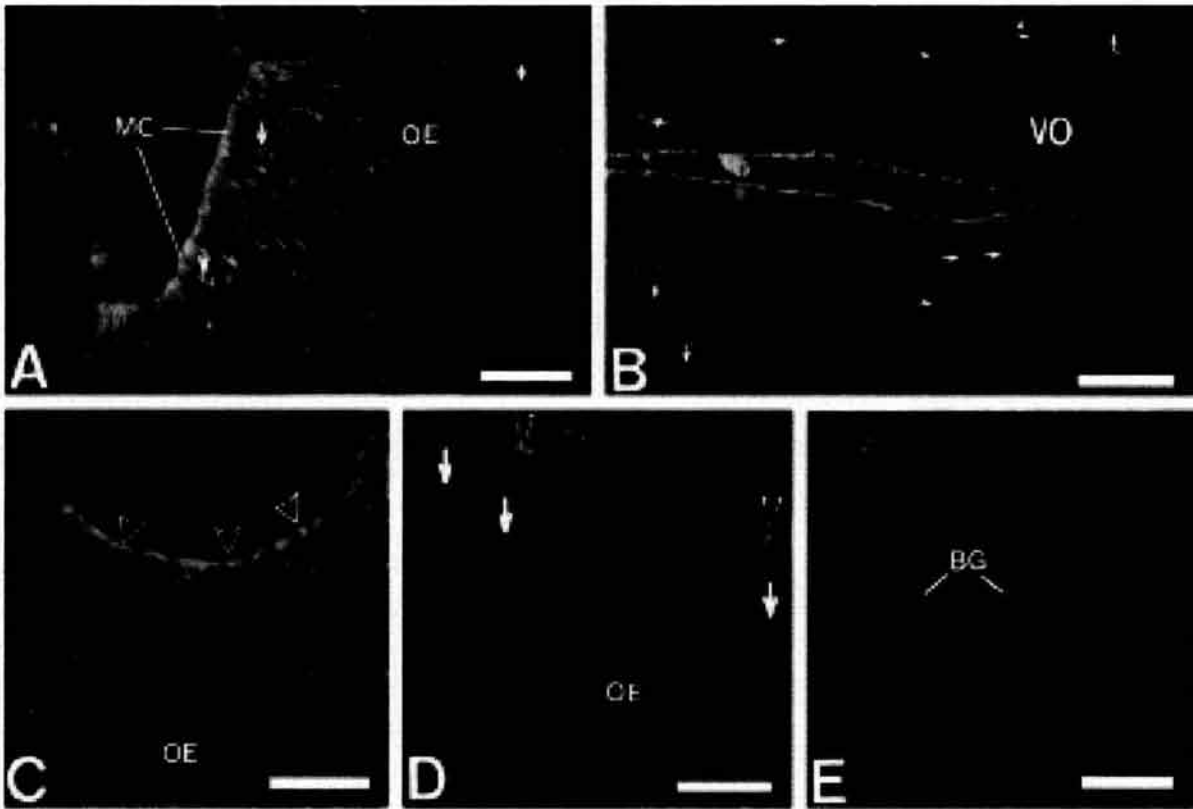


Figura 26. Inmunorreactividad a la nNOS (IR-nNOS) en la cavidad nasal del axolotl, *Ambystoma mexicanum*. **(A)** secciones coronales donde se muestra IR-nNOS en las dendritas, algunos somas de las ORN (flechas), complejos mucociliar/microvilar (MC) del epitelio olfatorio (OE) de la cámara principal. **(B)** epitelio olfatorio del órgano vomeronasal (VO) muestra IR-nNOS en las dendritas y algunos somas de las ORN (flechas) tanto como en las células basales (flechas curvas). **(C)** dendritas y botones dendríticos inmunorreactivos (cabeza de flecha) de las ORN en el OE. **(D)** IR-nNOS en los somas de las ORN (flechas), dendritas y botones dendríticos (cabeza de flecha) de la cámara principal. **(E)** IR-nNOS en las glándulas de Bowman (BG). **Barras:** 50 μm (A); 120 μm (B); 30 μm (C y D); y 100 (E).

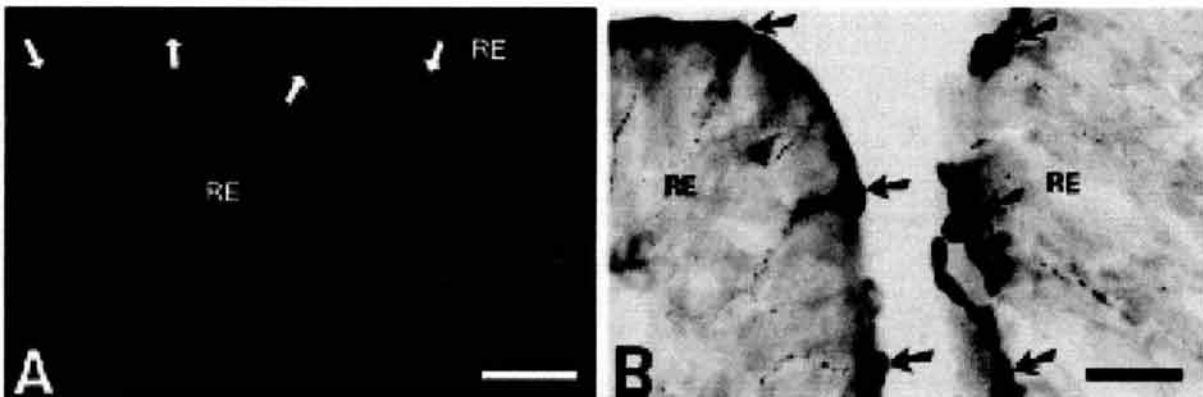


Figura 27. Cortes coronales de la cavidad nasal del axolotl. **(A)** IR-nNOS y tinción intensa a la NADPH-d **(B)** en las células pequeñas (flechas) del epitelio respiratorio (RE) (flechas). **Barra:** 50 μm .

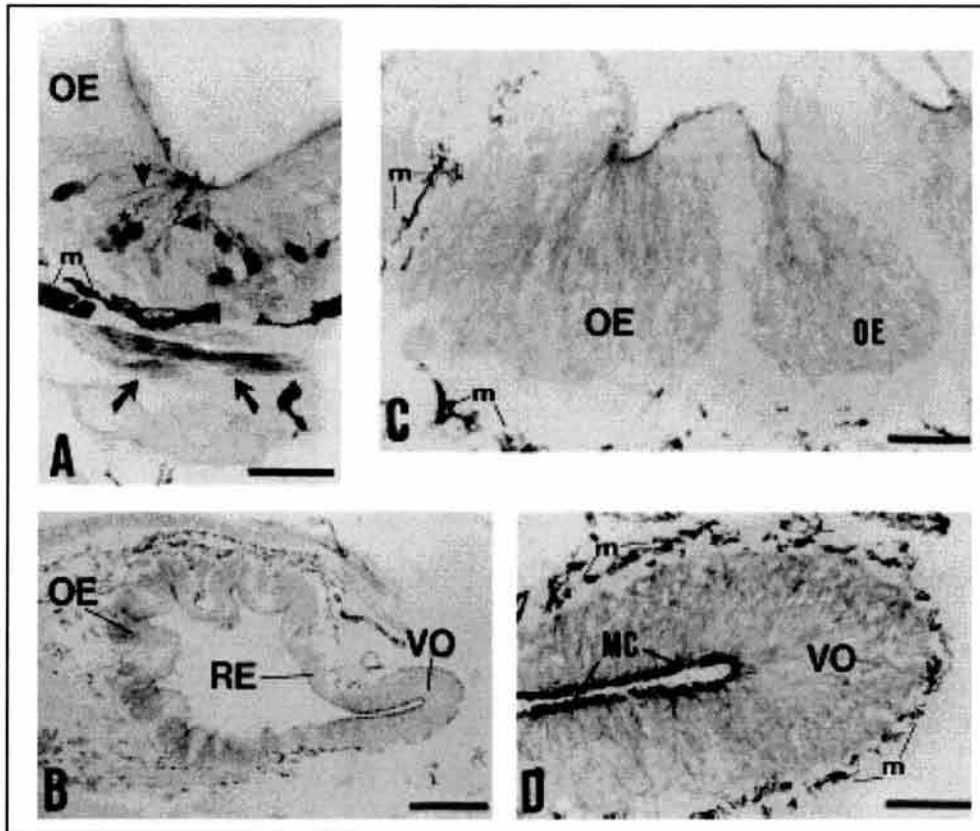


Figura 28. Cortes coronales de la cavidad nasal del axolotl axotomizado con tinción histoquímica para la NADPH-d. **(A)** Epitelio olfatorio (OE) de la cámara principal mostrando pocas ORN positivas a la NADPH-d a las 2 semanas después de la axotomía. Nótese el núcleo con signos de cromatólisis (asterisco), las dendritas en forma de tirabuzón (cabeza de flecha), y la tinción a la NADPH-d granular en los ases de fibras nerviosas; m, melanocitos. **(B)** vista panorámica de la cámara principal a las 5 semanas postaxotomía. No se observa tinción a la NADPH-d en los sitios donde degeneraron las ORN. **(C,D)** epitelio olfatorio de la cámara principal y órgano vomeronasal (VO), respectivamente, a las 5 semanas postaxotomía. Tinción a la NADPH-d esta ausente en las ORN pero permaneció en el complejo mucociliar/microvililar (MC). **Barra:** 50 μm (A), 550 μm (B), 48 μm (C), y 150 μm (D).

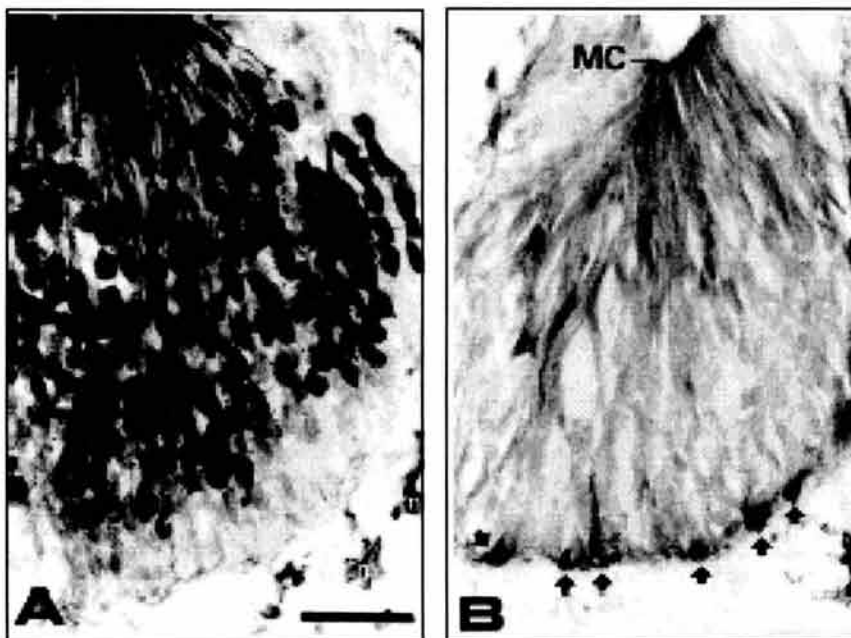


Figura 29. Cortes coronales de la cavidad principal mostrando el epitelio olfatorio del axolotl, 2 semanas después de la axotomía. **(A)** neuronas receptoras olfatorias del lado control mostrando intensa tinción a la NADPH-d; m, melanocitos. **(B)** Lado axotomizado mostrando una tinción tenue en las dendritas y en el complejo mucociliar /microvililar (MC). Nótese la intensa tinción de las células basales en el lado axotomizado (flechas) comparado con el lado control. **Barras:** 40 μm .

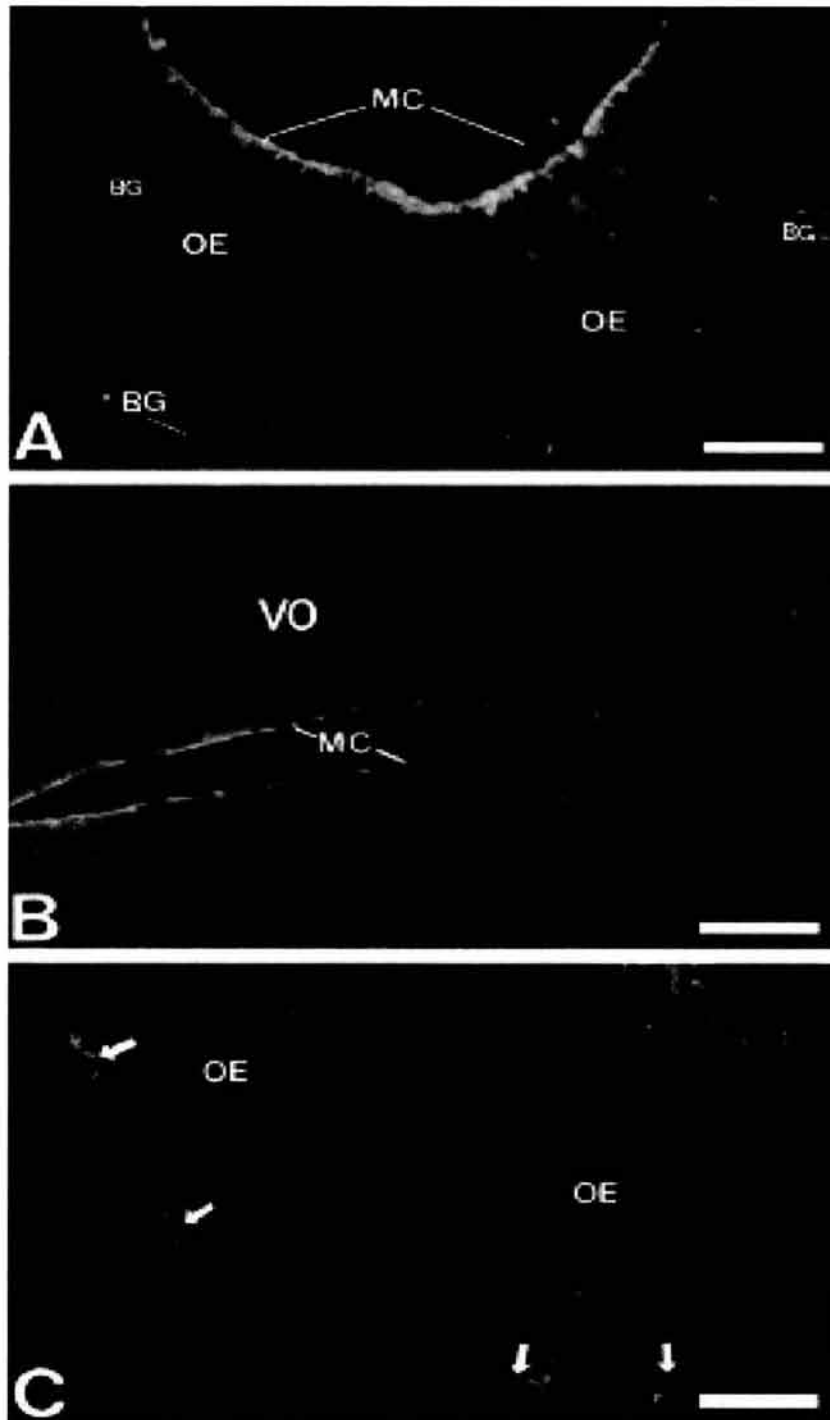


Figura 30. Inmunorreactividad a la nNOS (IR-nNOS) en la cavidad nasal del axolotl de 2 semanas después de la axotomía. **(A)** En la cámara principal, la inmunorreactividad en las ORN esta únicamente presente en algunas dendritas, mientras que en los complejos mucociliar/microviliar (MC) y en las glándulas Bowman (BG), la IR-nNOS permanece. **(B)** En el órgano vomeronasal (VO), la IR-nNOS esta casi ausente en las ORN y permanece en los MC. **(C)** Inmunorreactividad intensa se ve también a las 2 semanas después de la axotomía en las células basales en la parte inferior del epitelio olfatorio (OE) (flechas). **Barras:** 120 μm (A y B), y 50 μm (C).

CAPITULO III

Efecto de la Inhibición de la Sintasa del Óxido Nítrico Durante el Desarrollo del Sistema Nervioso Central

Introducción

La reacción enzimática que cataliza la NOS, para producir NO, se inhibe de manera endógena por fosforilación y exógenamente por diversas sustancias como los análogos de la L-arginina, por derivados de indazol e imidazol unidos al grupo hemo, antagonistas de la calmodulina, colorantes redoxactivo e inhibidores de la flavoproteínas (Fukuto y Chaudhuri, 1995; Moncada et al., 1997, Boucher et al., 1999). De los inhibidores de las isoformas de la NOS, los derivados análogos a la L-arginina, son los más utilizados en experimentos farmacológicos y clínicos (tabla VIII), como son: el N-G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), N-G-nitro-L-arginina (L-NOARG), N-monometil-L-arginina (L-NMMA), y nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) entre otros. El L-NOARG y su metil éster (L-NAME) se identificaron como potentes inhibidores de las isoformas NOS neuronal y endotelial (Mülsch y Busse, 1990; Rees et al., 1990; Moore et al., 1991; Mayer et al., 1993; Klatt et al., 1994; Pfeiffer et al., 1996). Además el L-NAME inactiva a la isoforma NOS inducible (Boucher et al., 1999).

El metabolismo de la L-NAME y la L-NOARG se estudio en plasma y sangre de perro (Krejcy et al., 1993). La vida media de la L-NAME en plasma es de 222 min. En plasma humano este valor es idéntico, 207 min. Sin embargo, la vida media de L-NAME es significativamente más corta, en plasma que en Buffer de fosfatos a pH 7.4, (365 min) (Pfeiffer et al., 1996). Esto puede deberse a que las esterasas del plasma pueden contribuir a la hidrólisis de L-NAME, además de la aparentemente catálisis álcali, hidrólisis no enzimática a la que esta expuesta (Pfeiffer et al., 1996). El metabolismo de L-NAME es mas rápido en sangre humana integra ($t_{1/2}$ = 29 min) (Pfeiffer et al., 1996) o de perro

($t_{1/2}$ = 64 min) (Krejcy et al., 1993), lo que indica que el metabolismo de L-NAME es principalmente catalizado por esterasas de células sanguíneas.

Tabla VIII. Inhibidores de la NOS

Composición	Abreviatura	Potencia de inhibición
N-G-nitro-L-arginina metil éster	L-NAME	nNOS>eNOS>iNOS
N ^ω -monometil-L-arginina	L-NMMA	nNOS= eNOS>iNOS
N ^ω -nitro-L-argina	L-NOARG	nNOS= eNOS>>iNOS
N ^ω -amino-L-argina	L-NAA	nNOS= iNOS>Enos
7-nitroindazol	7-NI	nNOS= eNOS=iNOS
N ^δ -iminoetil-L-ornitina	L-NIO	iNOS>eNOS= nNOS*
Aminoguanidina		iNOS>eNOS=nNOS

*A pesar de su falta de selectividad en las enzimas aisladas, 7NI muestra una clara selectividad para nNOS.

Tabla modificada de Moncada et al., 1997.

Inhibición del NO durante el desarrollo

La inhibición de la NOS durante periodos críticos del neurodesarrollo causa alteraciones en el desarrollo de la vía retinotectal (Myslivecek et al., 1996), alteraciones en el establecimiento de proyecciones axonales (Peunova et al., 2001), alteraciones en la modulación de la proliferación neuronal (Peunova et al., 2001) y alteraciones funcionales como en el aprendizaje y memoria (Myslivecek et al., 1996; Sánchez-Islas et al., 2003). En la formación de las conexiones tálamocorticales, Finney y Shatz (1998) reportaron que se lleva a cabo aún bajo una inhibición crónica del NO postnatalmente, lo que sugiere que el NO actúa selectivamente en algunas vías y no es esencial para llevar a cabo este proceso.

Los primeros trabajos que se realizaron para ver el efecto de los inhibidores de la NOS se debieron a la prolongada hipertensión que produce el L-NAME. Este se empleó experimentalmente para investigar el papel del NO en la hipertensión durante el embarazo y en un modelo de preeclamsia en la rata. La aplicación de L-NAME (25 a 50 mg/d) en uno de los primeros días del periodo de gestación muestra que las ratas tratadas tienen una presión arterial alta y sus crías al nacer tienen un peso y tamaño menor sin presentar malformaciones congénitas (Yallampalli y Garfield, 1993). Además hay incremento significativo en la mortalidad fetal con respecto a los controles. Cuando la aplicación de L-NAME (25 a 50 mg/kg/d) es continua para producir una inhibición crónica de la NOS se observan resultados similares (Buhimschi et al., 1995; Edwards et al.,

1996). Sin embargo, Diket y col. (1994) administraron oralmente L-NAME (0.1, 0.3 ó 1 mg/ml) a ratas grávidas por periodos largos durante la gestación, desde el día de gestación (dg) -13 al dg-19 o del dg-13 al dg-20 no observaron un incremento de la presión sanguínea en las ratas tratadas, pero hubo una reducción dosis dependiente, en el peso de la placenta y del feto. Además observaron una alta incidencia de necrosis hemorrágicas en los miembros posteriores de los fetos expuestos a las dos concentraciones altas. Este último efecto se neutralizó con la administración de nitroprusiato de sodio, un donador del NO. Por otro lado, los efectos del tratamiento crónico de otro inhibidor del NO, el L-NOARG (0.2 a 0.4 mg/kg/d), producen los mismo síntomas que con L-NAME, con la diferencia que las crías tienen una menor incidencia de malformaciones en las patas posteriores (Salas et al., 1995).

Wu et al. (1994), encontraron que durante el desarrollo del sistema visual del pollo, en el tectum hay altas concentraciones de NO durante el periodo de refinamiento de las proyecciones retinotectales. Los autores demostraron que al inhibir a la NOS baja la eliminación de las proyecciones retinotectales y concluyen que el NO sirve como un factor regulador para el refinamiento proyecciones retino-tectales durante el desarrollo. Por otro lado, los ratones carentes del gen de la *nNOS*^{-/-} no muestran anomalías evidentes neuroanatómicas y ni sensoriomotoras lo que sugiere que otras isoformas de la NOS en el cerebro, como la iNOS y la eNOS pueden generar NO y compensar la falta de la nNOS (Huang et al., 1993; Nelson et al., 1995; Dinerman et al., 1994). Sin embargo diversos grupos de investigación coinciden que el efecto de la inhibición del NO es a nivel neuromolecular (Kalb y Hockfield, 1990; Kalb y Agostini, 1993; Kalb, 1994), y esto quiere decir que afecta la presencia de proteínas que participan en la maduración y desarrollo del SNC. Kalb y Agostini (1993) reportaron que la inhibición de la NOS durante el desarrollo, provoca la falta de expresión de proteínas del tipo de proteoglicanos de la superficie neuronal reconocidas por el anticuerpo monoclonal Cat-305 que se expresan en las motoneuronas maduras de la médula espinal, lo que indica que el NO participa en la maduración de estas neuronas.

Las sinapsinas son fosfoproteínas que participan en la plasticidad y maduración sináptica. Por lo que nos interesó saber si estas proteínas se afectan con la inhibición de la NOS.

Sinapsinas

En el desarrollo del sistema nervioso central, en particular durante la sinaptogénesis, se expresan proteínas que participan en la maduración sináptica (Südhof et al., 1989; Lu et al., 1992; Schaeffer et al., 1994; Valtorta et al., 1995; Ferreira et al., 2002). Las sinapsinas son proteínas

asociadas a las vesículas presinápticas que forman una familia de fosfoproteínas específicas de neuronas, las cuales intervienen en la movilización de las vesículas sinápticas previo a la liberación de neurotransmisores y en la plasticidad neuronal (Fig. 31). Se han identificado tres isoformas, la sinapsina I, II (De Camilli et al., 1983; De Camilli et al., 1990) y recientemente se describió un tercer tipo, la III (Hosaka et al., 1998; Kao et al., 1998; Ferreira et al., 2000). Las sinápsinas I y II están altamente concentradas en las terminales presinápticas nerviosas mientras que la III se localiza en el soma de la neuronas del sistema nervioso central (De Camilli et al., 1990; Ferreira et al., 2000). Estas proteínas están asociadas a la superficie citoplasmática de las vesículas sinápticas (De Camilli et al., 1983; De Camilli et al., 1990; Greengard et al., 1993), y juega un papel en la formación de sinapsis. La inyección de sinapsina a blastómeros de *Xenopus* aceleran la formación de sinapsis (Lu et al., 1992; Schaeffer et al., 1994; Valtorta et al., 1995). Además, la supresión de sinapsina I o la sinapsina II dan como resultado la inhibición de la sinaptogénesis en las neuronas hipocampales (Chin et al., 1995; Ferreira et al., 1995, 1996, 1998).

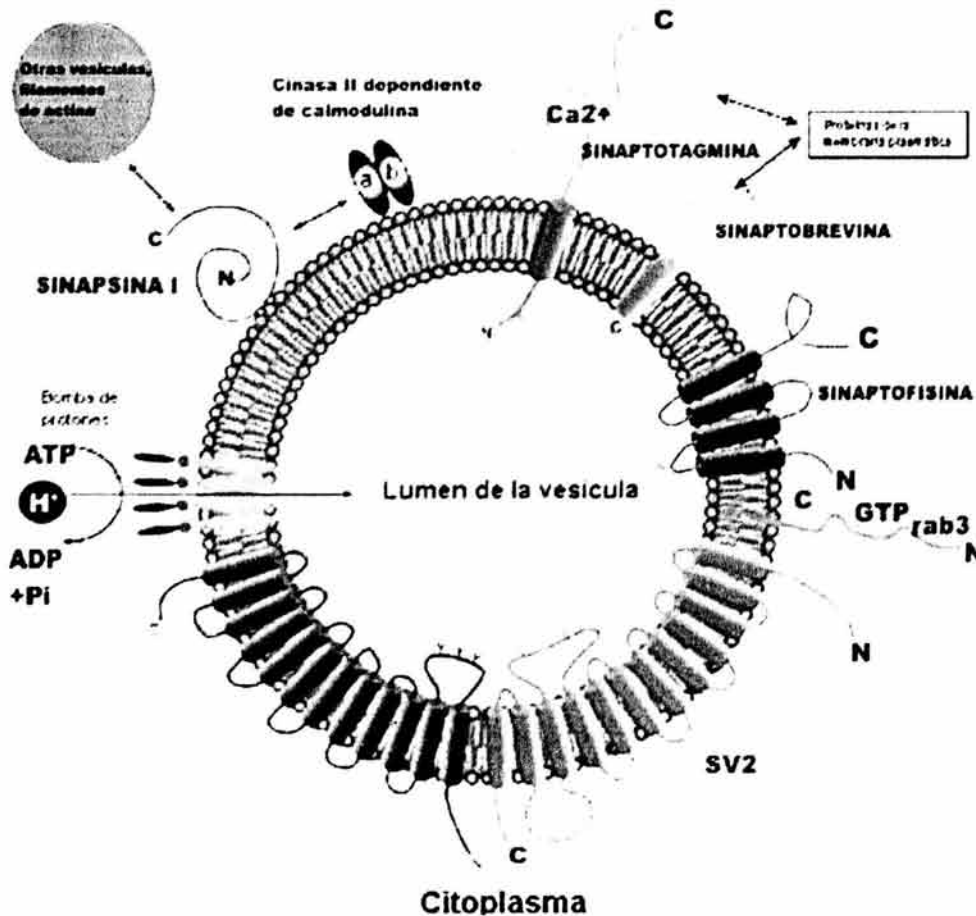


Figura 31. Representación esquemática de la estructura y topología de las principales proteínas de una vesícula sináptica. N, amino, y C, carboxilo terminal. Tomado de Zigmond et al. 1999.

Varios estudios han sugerido distintos papeles de la sinapsina I o de la sinapsina II durante el desarrollo neuronal. En cultivos de neuronas hipocámpales, la sinapsina I juega un papel en la elongación axonal y la ramificación (Chin et al., 1995), mientras que la sinapsina II en la elongación de prolongaciones no diferenciadas (Ferreira et al., 1995, 1998).

Sinapsinas y el NO

Las sinápsinas pueden interactuar con lípidos y proteínas de las vesículas sinápticas y con otras del citoesqueleto, como la actina, para participar en la movilización y la regulación de la liberación de neurotransmisores (Meffert y Calakos 1996; Jaffrey et al., 2002). La especificidad de las reacciones del óxido nítrico con su blanco neuronal se determina en parte por la precisa localización celular de la nNOS. En estudios recientes de Jaffrey et al. (2002) reportaron que la localización de la nNOS en la terminal presináptica depende de la formación de un complejo ternario entre la NOS, la sinapsina I y la proteína CAPON (carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS). La falta de sinapsina I provoca cambios de la localización, tanto de la nNOS como del CAPON afectando las funciones celulares de este complejo ternario (Jaffrey, 2002). Las sinápsinas tienen funciones similares a las del NO a nivel neuronal como son: la liberación de neurotransmisores, la formación de arborizaciones dendríticas y maduración sináptica (Meffert et al., 1994; Montague et al., 1994). Además, el ratón carente del gen de la *nNOS*^{-/-} muestra defectos en la arborización dendrítica (Inglis et al., 1998), los cuales son similares a los defectos encontrados en los ratones carentes del gen de sinapsina I (Chin et al., 1995). Este hecho sugiere que existe una relación funcional estrecha entre el NO y las sinápsinas, por lo que el déficit en la morfología dendrítica o liberación de neurotransmisores en los ratones deficientes de sinápsinas reflejarían un decremento en el acceso a la nNOS en la terminal sináptica. Sin embargo, no se sabe si la ausencia del NO afectaría la presencia y/o actividad de las sinápsinas durante el desarrollo cerebral.

PARTE I

Estudio del Efecto de la Inhibición de la NOS Durante el Desarrollo del Sistema Nervioso Central del Axolotl

Planteamiento del Problema

El NO participa en la sinaptogénesis, establecimiento del patrón sináptico, maduración y crecimiento cerebral durante el desarrollo del SNC. También se sabe que la biosíntesis de NO puede ser

bloqueada por inhibidores dirigidos a la NOS tales como, NOARG o el NAME. Nuestro interés fue determinar el posible papel del NO en el desarrollo del SNC del *A. mexicanum* y el efecto sobre la expresión de la sinapsina I.

Hipótesis

Si el NO participa en la sinaptogénesis, establecimiento del patrón sináptico, maduración y crecimiento cerebral durante el desarrollo del SNC. La aplicación de inhibidores de la NOS en estadios tempranos del desarrollo del sistema nervioso del *A. mexicanum*, tendrán un efecto sobre el proceso de maduración y sinaptogénesis neuronal.

La inhibición de la NOS provocará una disminución de la inmunorreactividad a la sinapsina I.

Objetivo General

Determinar el posible papel que juega el óxido nítrico en la formación y desarrollo del cerebro del *Ambystoma mexicanum*, mediante la utilización de inhibidores (L-NAME y L-NOARG) de la sintasa del óxido nítrico.

Objetivos Específicos

Determinar el efecto de la inhibición de la NOS sobre la actividad de la NADPH-d e inmunorreactividad a la sinapsina I, en cortes de cerebro de embriones y larvas del *A. mexicanum*, tratadas con L-NAME o L-NOARG desde el día 8 embrionario hasta los 30 días de desarrollo larvario.

Determinar los cambios en el peso, talla y morfológicos macroscópicos de los embriones y las larvas del *A. mexicanum* tratadas con los inhibidores de la NOS comparadas con los controles.

Establecer las diferencias en la distribución de la tinción a la NADPH-d y la inmunorreactividad a la sinapsina I en los cortes cerebrales de embriones de 8 días y de larvas de 14, 16, 20 y 30 días de desarrollo del *A. mexicanum* tratadas con los inhibidores con respecto a los controles.

Cuantificar la mortalidad durante el desarrollo de las larvas tratadas y controles.

Materiales y Métodos

Para la realización de estos experimentos se seleccionaron huevos de axolotl fecundados y en la etapa de neurulación. El procedimiento para la obtención de ovoposiciones se realizó como se describe en la secciones de materiales y métodos de la parte I de esta tesis (ver pág. 20). A los 8 días del desarrollo se formaron dos grupos experimentales y uno control (Tabla IX), cada uno con 50 huevos. A todos los huevos se les hizo una pequeña perforación en la cubierta gelatinosa y vitelo que los rodea para que penetrara el inhibidor. El inhibidor se disolvió en la solución de Steinberg al 20% y en la tabla IX se muestran la concentración usada para cada uno. La solución de Steinberg al 20% se cambió diariamente por 30 días. Los huevos del grupo control únicamente se mantuvieron en solución de Steinberg al 20%, la cual se cambio diariamente durante el mismo tiempo que los experimentales.

Tabla IX. Grupos experimentales

Grupo I (n=100)	L-NAME 2.5 mM + sol. Steinberg al 20%
Grupo II (n=100)	L-NOARG 2.5 mM + sol. Steinberg al 20%
Grupo III (n=100)	Control solo en solución de Steinberg al 20%

Durante el transcurso de los experimentos se realizaron observaciones diarias del desarrollo de los embriones y larvas. Se tomó la talla de 10 animales por grupo (n=10) a los 10, 12, 14, 16, 18, 20, 26, 28 y 30 días del desarrollo. También se contabilizó la mortalidad y se observó la anatomía de las larvas. Además se colectaron 4 ejemplares (embriones y larvas) a los 8, 14, 16, 20 y 30 días, las cuales se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 h. Se equilibraron en sacarosa al 30% se almacenaron hasta su uso.

Histoquímica para la NADPH-d

Se llevó a cabo esta técnica en cortes alternados seriados de cerebro de las larvas colectadas, la cual se explica con detalle en la sección de materiales y métodos de la parte I de esta tesis (ver páginas 20-21).

Inmunohistoquímica para la sinapsina I

En los corte alternos se les aplicó la técnica de inmunohistoquímica con el complejo avidina-biotina-peroxidasa empleando un kit ABC (PK-6105, Vector, USA). Los cortes se incubaron en 0.03%

de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por 30 min y entonces se lavaron con 0.1 M buffer fosfatos salino (PBS). Entonces se incubaron por 1 h en PBS con 0.3% de Tritón X 100 (BPS-T), 1% albumina bovina (AB), 1% de suero normal de conejo (SC) y después se incubaron por 3 días con un primer anticuerpo policlonal contra sinapsina I a/b a 4°C (Santa Cruz, USA), diluido 1:600 en PBS-T, 1% SC. Seguido de los lavados en PBS, se incubaron por 2h con anti IgG biotinilada de cabra hecho en conejo (Vector, diluido 1:200). Después de otros lavados en BFS, los cortes se incubaron por 1h con el complejo avidina-biotina-peroxidasa. La actividad de la peroxidasa se reveló con una reacción de una mezcla de 10 mg de 3,3-diaminobenzidina en 26 ml de buffer Tris-HCl salino (0.005 M, pH 7.6), 12 μ l H_2O_2 al 30 % y 300 μ l de sulfato de níquel al 30%. Posteriormente se lavaron con PBS, se secaron, se deshidrataron con alcoholes graduales (70, 80, 96 y 100%), y xilol y se montaron con Enthelan. Las preparaciones se analizaron bajo un microscopio Leitz Laborlux 12 equipado con una cámara digital (Spot camera) con la cual se tomaron fotos y se digitalizaron en una computadora.

Análisis Estadístico

Todos los resultados de la inhibición se presentan como el promedio \pm SEM. La comparación estadística entre las regiones positivas de los grupos tratados L-NAME y L-NOARG y grupo control se hizo por la prueba de "t" de Student y la ANOVA de una sola vía, Student Newman-Keuls. La significancia se asumió con los valores de $P < 0.05$.

Resultados

Las larvas tratadas con L-NAME y L-NOARG (2.5 mM) no presentaron ninguna alteración macroanatómica evidente comparadas con los controles. La eclosión de las larvas en los tres grupos ocurrió de forma normal ya que fue entre los días 13 y 15 del desarrollo.

En las larvas tratadas y las controles, procesadas para la técnica de histoquímica para la NADPH-d, no observamos algún cambio en la tinción ni en la distribución de la enzima. La inmunohistoquímica para la sinapsina I, no reveló cambios de expresión de la proteína (Fig. 32 C y D). Tanto las larvas tratadas como las controles presentaron una fuerte marca NADPH-d/NOS en la mayoría de las estructuras cerebrales analizadas.

Las larvas tratadas tanto con L-NAME como con L-NOARG, entre los días 10 y 14 del desarrollo, tuvieron una talla menor, la cual resulta ser significativa comparada con el grupo control (Fig. 33). Después del día 18 del desarrollo hasta el final del tratamiento, el grupo tratado con

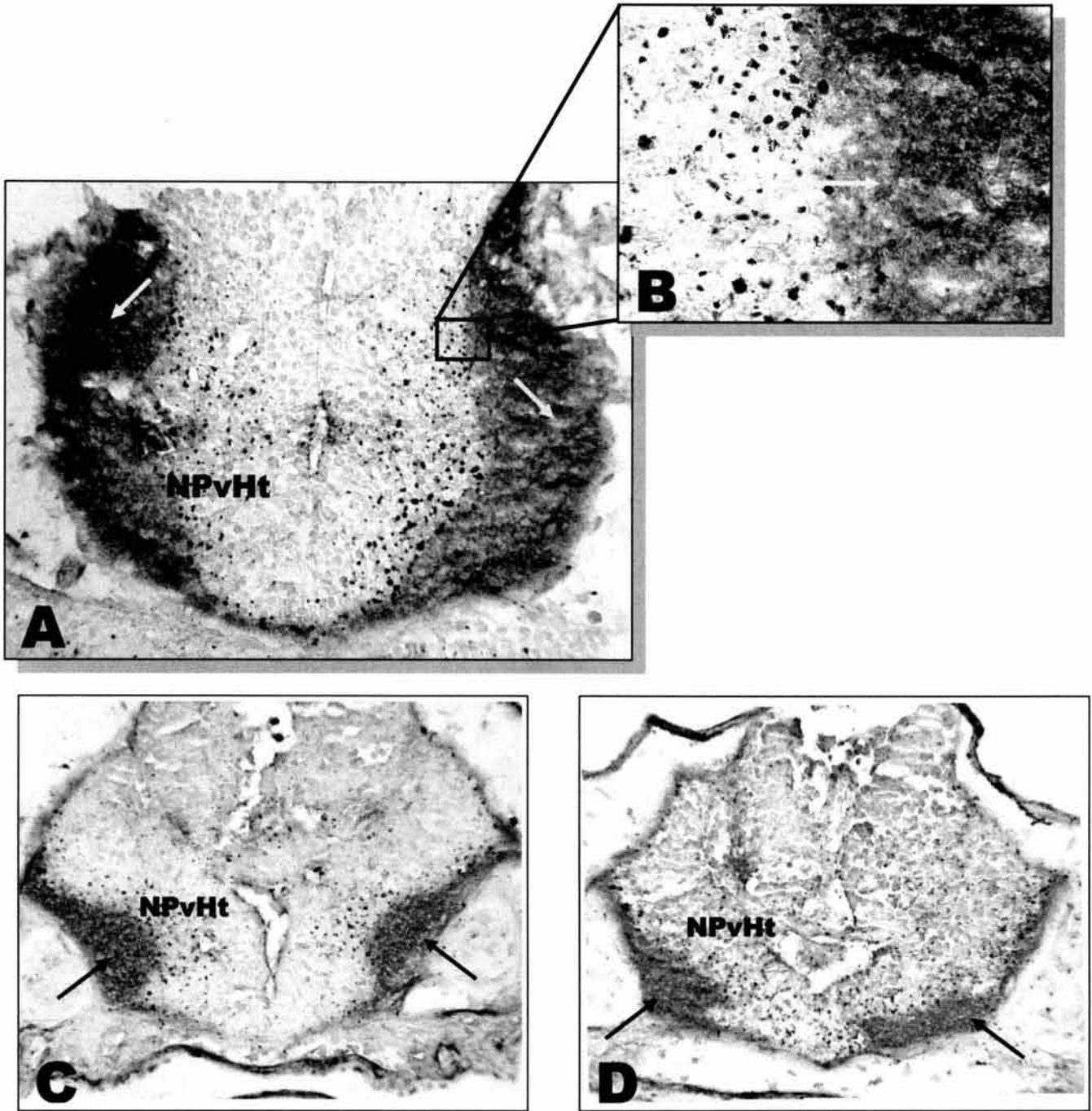


Figura 32. Inmunohistoquímica a sinapsina I. Fotomicrografías de cortes coronales (20 μm) de cerebro de larva de *Ambystoma mexicanum* de 30 días de desarrollo larvario. **A.** Núcleo paraventricular hipotalámico (NPvHt) con inmunorreactividad a sinapsina I en la zona del neuropilo (\uparrow). **B.** Una sección del NPvHt a mayor aumento (400 X). Núcleo del fascículo medial telencefálico (NFMT) de una larva control (**C**) y una tratada con L-NAME (**D**) donde se observa inmunorreactividad a sinapsina I en la zona del neuropilo (\uparrow). **Barras:** 16 μm (A), 10 μm (B), 40 μm (C y D).

L-NAME mostró una talla mayor significativa comparado con el control. Mientras que el grupo tratado con L-NOARG mostró una talla menor significativa con respecto al control (Fig. 33). El porcentaje de mortalidad contabilizado al final del tratamiento fue mayor en los grupos tratados con L-NAME (31 %) y L-NOARG (23 %) comparado con el control (15 %) (Fig. 34). La mortalidad por día fue mayor en los primeros 5 días de tratamiento, principalmente en las larvas tratadas con L-NOARG. Después de los 5 días de tratamiento disminuye la mortalidad (una por día), mientras que en el grupo control ya no hay mortalidad (Fig. 35).

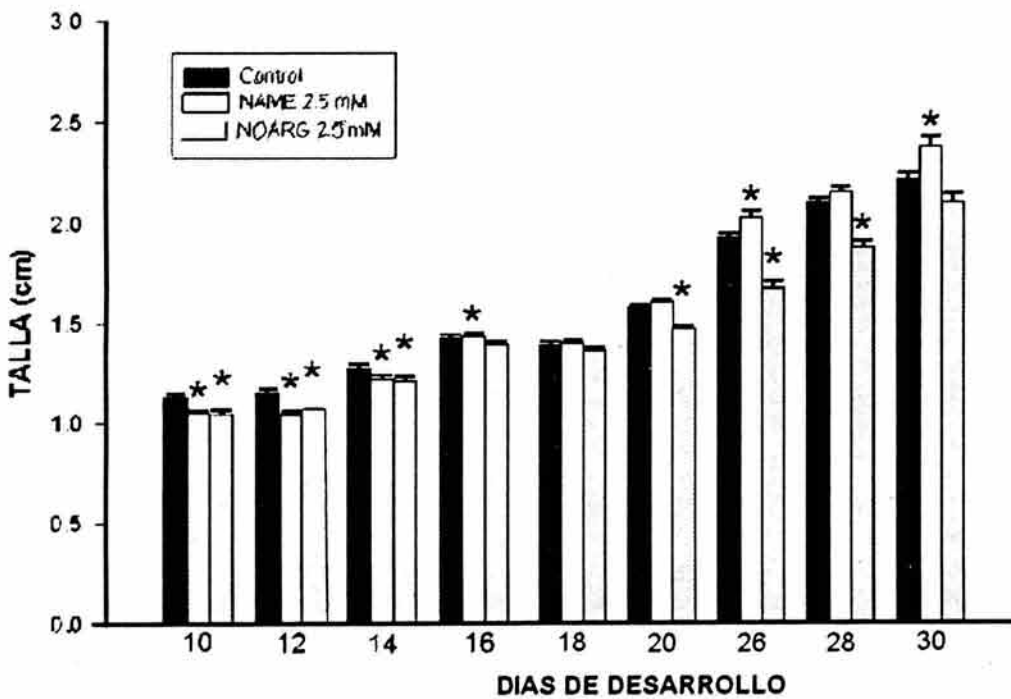


Figura 33. Efecto de la inhibición de la NOS con NAME y NOARG sobre la talla del *A. mexicanum* durante el desarrollo. Las líneas denotan los SEM y los asteriscos representan los grupos que fueron significativos, $p < 0.05$ (Anova de dos vías, Student-Newman-Keuls).

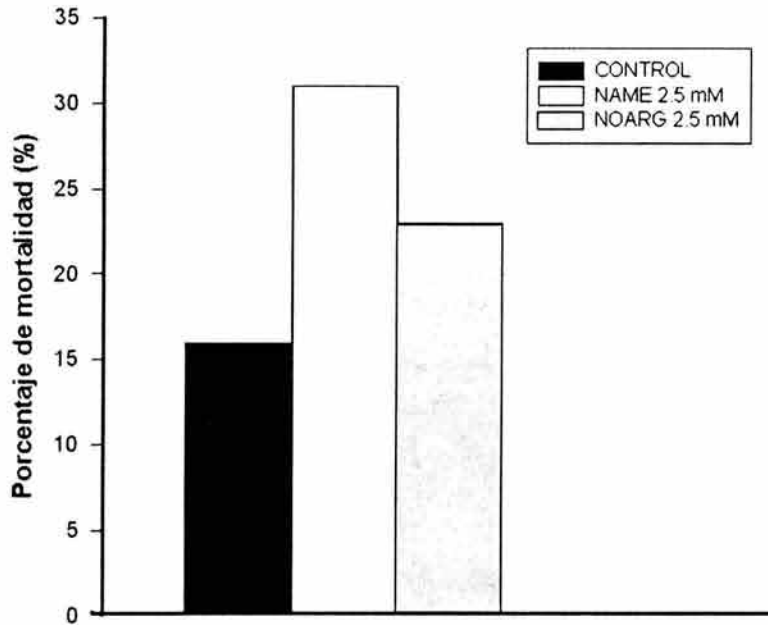


Figura 34. Efecto de la inhibición de la NOS con NAME y NOARG durante el desarrollo del *A. mexicanum*. La grafica muestra el porcentaje de mortalidad en los grupos tratados y el control, en cada caso la n= 100.

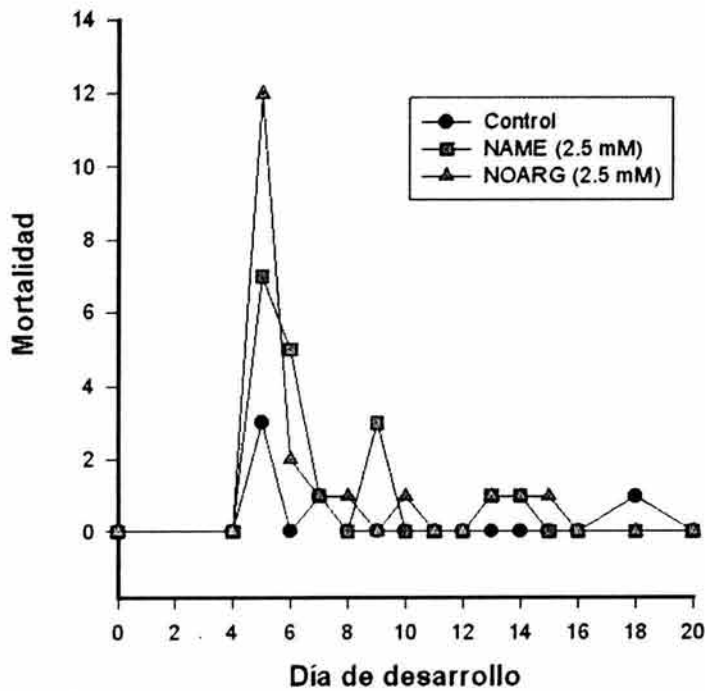


Figura 35. Efecto de la inhibición de la NOS con NAME y NOARG durante el desarrollo del *A. mexicanum*. La grafica muestra la mortalidad cuantificada por día en los grupos tratados y el control.

PARTE II

Estudio del Efecto de la Inhibición de la Sintasa del Óxido Nítrico Durante la Etapa Postnatal Temprana del Cerebro de la Rata

Planteamiento del Problema

La inhibición de la NOS por sus antagonistas durante el desarrollo del SNC, no produce alteraciones macroanatómicas, tal como se observa en el ratón carente de la nNOS (Inglis et al., 1998). Sin embargo, si causa alteraciones a nivel molecular como por ejemplo la falta de expresión de proteínas que presentan las neuronas maduras (Kalb y Hockfield, 1990; Kalb y Agostini, 1993; Kalb, 1994) y en la sinaptogénesis y refinamiento de proyecciones axonales (Wu et al., 1994), etc. en este estudio nos interesa conocer el efecto de la inhibición de la enzima NOS, por su antagonista L-NAME en el periodo postnatal de la rata, sobre la inmunoreactividad de la proteína sinápsina I en estructuras cerebrales relacionadas con funciones cognitivas (corteza prefrontal, hipocampo y tálamo dorsal).

Hipótesis

El NO tiene una importante participación en el desarrollo del SNC, en especial durante la maduración sináptica, fase en la que también hay una alta expresión de la proteína sinápsina I. La aplicación de inhibidores de la NOS, como el L-NAME, en este periodo crítico de la maduración de los circuitos neuronales, provocará una disminución de la expresión de sinápsinas en la corteza prefrontal, hipocampo y tálamo dorsal.

Objetivo General

Determinar el papel del óxido nítrico sobre la expresión de sinápsinas en diferentes núcleos cerebrales de ratas tratadas del día 3 al 23 postnatal con el inhibidor de la NOS, L-NAME.

Objetivos Específicos

Determinar el efecto de la inhibición de la NOS sobre la actividad de la NADPH-d e inmunoreactividad a la sinápsina I, en cortes de cerebro al nivel de corteza prefrontal, hipocampo y tálamo, en grupos de crías de ratas de 24 días postnatales, tratadas del día 3 al 23 postnatal con L-NAME.

Cuantificar la densidad óptica de la presencia de la tinción a la NADPH-d por célula y por región en los núcleos: Corteza prefrontal, hipocampo y tálamo dorsal de las crías de ratas tratadas y controles.

Cuantificar la densidad óptica de la presencia de la inmunorreactividad a sinápsinas por región y subregión en los núcleos: Corteza prefrontal, hipocampo y tálamo dorsal, de las crías de ratas tratadas y controles.

Materiales y Métodos

Tratamiento

Se utilizaron crías de ratas Wistar (n=14) de uno y otro sexo, las cuales se trataron desde el día postnatal 3 hasta el día 23 con una dosis de 60 mg/kg/día de N-nitro-L-arginina metilester (L-NAME, Sigma), disuelto en solución salina (10 a 50 μ m dependiendo del peso corporal) y administrado una diariamente subcutáneamente. Los controles recibieron una dosis equivalente de solución salina.

Histoquímica para la NADPH-d e Inmunohistoquímica para la sinapsina I

Para la localización histoquímica de la actividad de la NADPH-d y la inmunohistoquímica para la sinapsina I, las crías control y L-NAME a los 24 días de edad se anestesiaron con pentobarbital 40 mg/kg i.p. y se perfundieron vía intracardiaca y se fijaron con 4 % de paraformaldehído en 0.1 M de buffer fosfatos salino (PBS). Se extrajeron los cerebros y se posfijaron en la misma solución por 16 h, se crióprotegeron con sacarosa al 30% y se hicieron cortes coronales seriados de 50 μ m a -20 °C en un criótomo. En los cortes del control y el tratado correspondientes al bregma -4.16 de Paxinos y Watson (1998) (Fig. 36A), realizamos las técnicas de histoquímica para la NADPH-d y la inmunohistoquímica para la sinapsina I descrito anteriormente.

Análisis cuantitativo de la histoquímica para NADPH-d e inmunohistoquímica para la sinapsina I

Se analizó la densidad óptica de la marca histoquímica e inmunohistoquímica en cortes coronales de la corteza prefrontal, subregiones del hipocampo y tálamo dorsal (Fig. 36A). Los cortes se observaron en un microscopio Leitz Laborlux 12 y se fotografiaron en una cámara digital SPOT 2

(Diagnostic Instruments, Inc), y capturadas y digitalizadas usando una computadora personal. La cuantificación se llevó a cabo en los dos hemisferios cerebrales de cortes coronales, en dos cortes alternados (uno para NADPH-d y uno para la sinapsina I) para cada animal (n=14). La densidad óptica de las áreas positivas fue cuantificada usando el programa de análisis de imágenes Scion Image (4.0.2, NIH, USA) estandarizado con una escala de grises entre el blanco (0) y negro (255). Para cada región cerebral, el promedio de la densidad óptica del grupo control se tomo como el 100%. En el caso de la histoquímica para la NADPH-d medimos la densidad óptica de algunos somas neuronales elegidos al azar en las mismas regiones para cuantificar cambios en la intensidad de tinción. El numero total de células procesadas en las diferentes regiones fueron: 121 en la corteza prefrontal, 174 en el hipocampo, y 246 en el núcleo geniculado lateral ventral del tálamo dorsal.

Análisis Estadístico

Los resultados de la cuantificación de las densidades ópticas de los experimentos de histoquímica e inmunohistoquímica se presentan como el promedio \pm s.e.m. La comparación estadística de estos datos entre el tratado L-NAME y grupo control se realizó por una prueba de "t" de Student pareada, la densidad óptica de las neuronas fue evaluada por medio de una prueba de "U" de Mann-Whitney. La significancia se asumió con los valores de $P < 0.05$.

Resultados

Los resultados se muestran de manera resumida, para mayor detalle ver el sobretiro: *Nitric oxide synthase inhibition during synaptic maturation decreases synapsin I immunoreactivity in rat brain. Nitric Oxide 10 (2004) 141-149*, en la sección de anexos.

Las crías tratadas postnatalmente del día 3 al 23 con L-NAME, tuvieron un decremento en el peso corporal del 15% comparado con el grupo de crías controles. No se observaron otras alteraciones macroanatómicas evidentes, ni tampoco en la actividad motora. Los cortes coronales cerebrales de las crías tratadas mostraron una reducción significativa de la inmunorreactividad a la sinapsina I en las áreas estudiadas: corteza prefrontal, hipocampo y tálamo dorsal con respecto a las crías control (Tabla IX, Fig. 36 D, E y F, Fig. 38). La actividad a la NADPH-d presento reducción de neuronas y fibras en esas mismas áreas (Fig. 36 B y C, Fig. 37) Estos resultados sugieren que las alteraciones causadas por la deficiencia de NO y sinápsinas en la etapa postnatal pueden estar

afectando funciones que dependen de la formación de conexiones sinápticas tales como aprendizaje y memoria.

TABLAIX. Análisis cuantitativo de las áreas cerebrales con inmunorreactividad a la sinapsina I.

Estructura Cerebral	Control (%)	L-NAME (%)	Decremento (%)
Corteza Prefrontal	100 ± 5.73	65.15 ± 2.60	34.85 ± 2.60
Hipocampo:			
Stratum oriens de CA1	100 ± 10.28	81.06 ± 8.40	18.94 ± 8.40
Stratum radiatum de CA1	100 ± 9.02	84.75 ± 7.35	28.47 ± 7.35
Stratum oriens de CA2	100 ± 9.34	71.53 ± 10.31	28.47 ± 10.31
Stratum radiatum de CA2	100 ± 8.04	70.88 ± 8.28	29.12 ± 8.28
Stratum oriens de CA3a	100 ± 4.25	66.59 ± 4.61	33.41 ± 4.61
Stratum lucidum de CA3a	100 ± 5.36	61.28 ± 5.98	38.72 ± 5.98
Stratum oriens de CA3b	100 ± 7.84	67.18 ± 6.88	32.82 ± 6.88
Stratum lucidum de CA3b	100 ± 7.19	58.89 ± 6.94	41.11 ± 6.94
Capa celular Granular del giro dentado	100 ± 10.24	69.61 ± 7.86	30.39 ± 7.86
Hilus	100 ± 7.84	64.87 ± 7.32	35.13 ± 7.32
Zona Polimórfica del giro dentado	100 ± 8.94	65.52 ± 6.87	34.48 ± 6.87
Stratum lacunosum-molecularis	100 ± 7.49	62.67 ± 4.86	37.33 ± 4.86
Capa interna del giro dentado	100 ± 6.46	61.08 ± 5.05	38.92 ± 5.05
Tálamo	100 ± 6.96	66.71 ± 4.76	33.29 ± 4.76

Cuantificación de la densidad óptica de la inmunorreactividad a sinapsina I en diferentes regiones del cerebro de las crías de rata del grupo control (salino) y L-NAME, tratados desde el día postnatal 3 al 23 y sacrificados en el día postnatal 24. Los promedios de las densidades ópticas del grupo control fueron tomados como el 100%. Un importante decremento en la densidad óptica fue observado en casi todas las regiones cerebrales de los grupos tratados. Los valores son el promedio ± s.e.m.

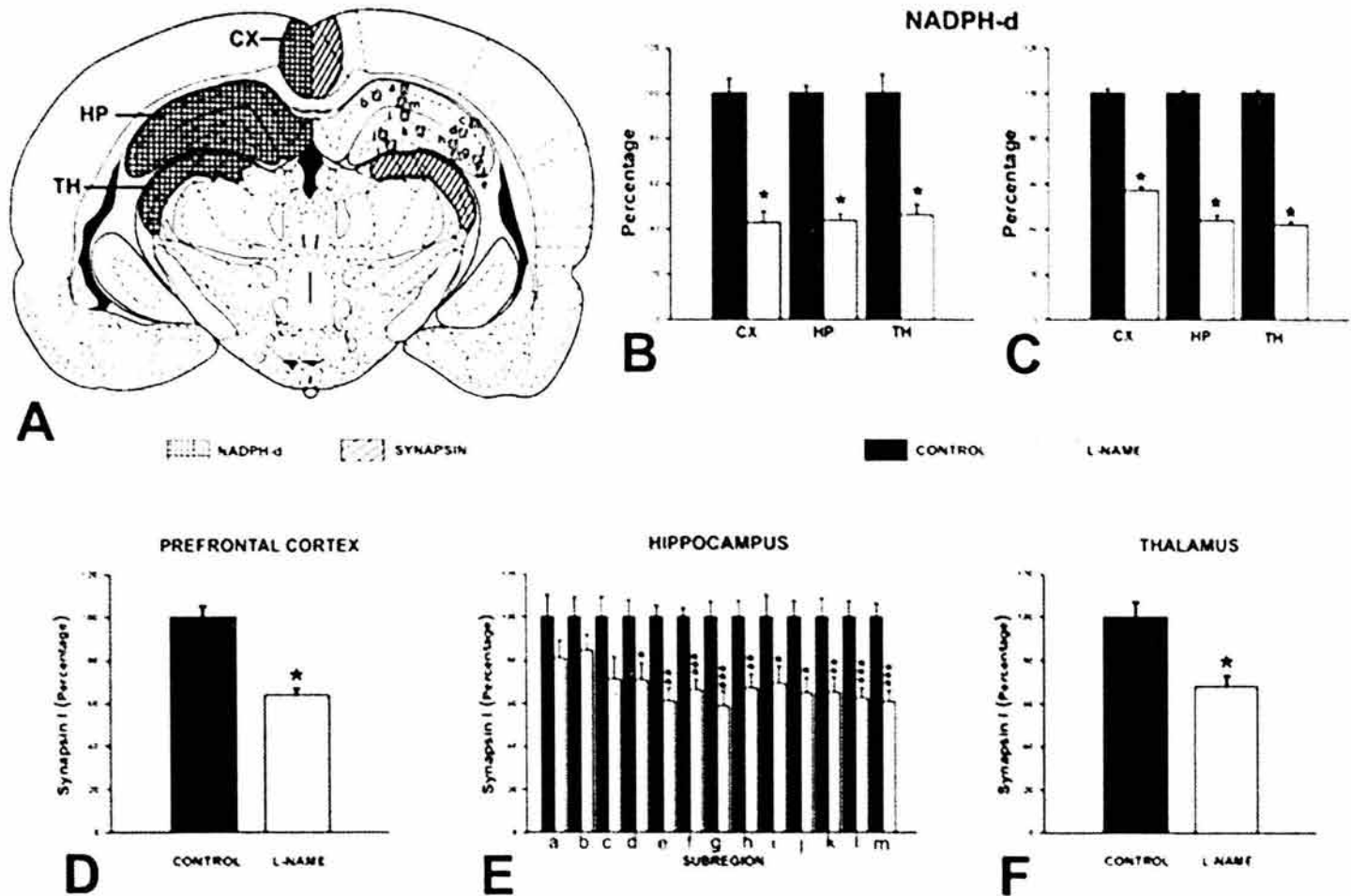


Figura 36. Análisis cuantitativo de la tinción a la NADPH-d y la inmunorreactividad a la sinapsina I en crías de 24 días tratadas con L-NAME del día 3-23 postnatales y controles (solución salina). **A.** Esquema donde se muestran las regiones cerebrales que se cuantificaron. La tinción a la NADPH-d (lado izquierdo) Corteza prefrontal (CP), Hipocampo (HP) y Tálamo (TA). La inmunorreactividad a sinapsina I (lado derecho) en CP, en el hipocampo se cuantificó por subregiones a) stratum oriens del CA1; b) stratum radiatum del CA1; c) stratum oriens del CA2; d) stratum radiatum del CA2; e) stratum lucidum del CA3a; f) stratum oriens del CA3a; g) stratum lucidum del CA3b; h) stratum oriens del CA3b; i) capa celular granular del giro dentado; j) hilus; k) zona polimórfica del giro dentado; l) stratum lacunosum-moleculare; m) capa interna del giro dentado y en el tálamo. **B.** y **C.** Graficas que muestran el efecto de la inhibición de la NOS sobre la tinción a la NADPH-d las tres regiones (**B**) y en los somas (**C**). En ambos casos muestran un decremento significativo de la tinción. **D.** y **F.** Efecto de la inhibición de la NOS sobre la inmunorreactividad a sinapsina I en CP, HP, TA. Un decremento significativo de la tinción se encontró en las tres regiones estudiadas, con excepción de las subregiones del hipocampo a, b y c. Los resultados se expresan como el promedio de los valores del grupo (7 ratas, 1 corte por rata) \pm s.e.m. La diferencia entre los grupos controles y experimentales se analizaron por una prueba de t de Student para las regiones * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ y una prueba U de Mann-Whitney para los somas * $P < 0.05$.

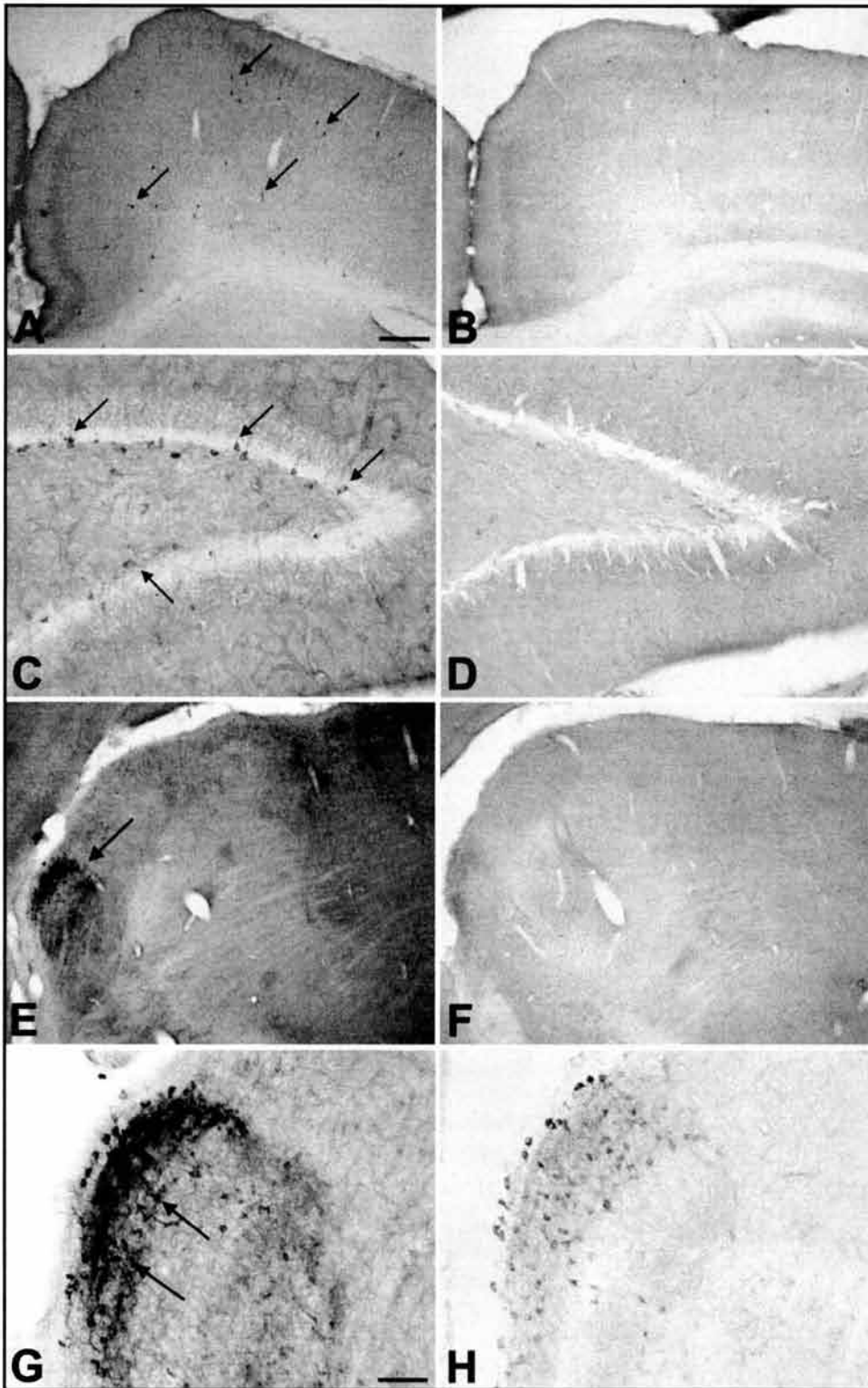


Figura 37. Histoquímica a la NADPH-d. Fotomicrografías de cortes coronales (50 μm) de cerebro de ratas de 24 días tratadas con L-NAME del día 3 al 23 postnatal y de controles (solución salina). Los cortes **A, C, E y G** del grupo control y **B, D, F y H** del grupo tratado con L-NAME. **A y B** corteza prefrontal; **C y D** hipocampo (Hilus); **E y F** tálamo dorsal; **H e I** magnificación de la zona del núcleo geniculado. Las flechas muestran neuronas y fibras teñidas. En todos los cortes del grupo tratado (izquierda) se observa una disminución de la intensidad de la tinción comparados con los cortes del control (derecho). Nótese la completa ausencia de neuronas teñidas en el hipocampo (**D**) y la reducción de la intensidad de la tinción en los somas positivos en el núcleo geniculado (**H**). **Barras:** 350 μm (**A-F**); 50 μm (**G-H**).

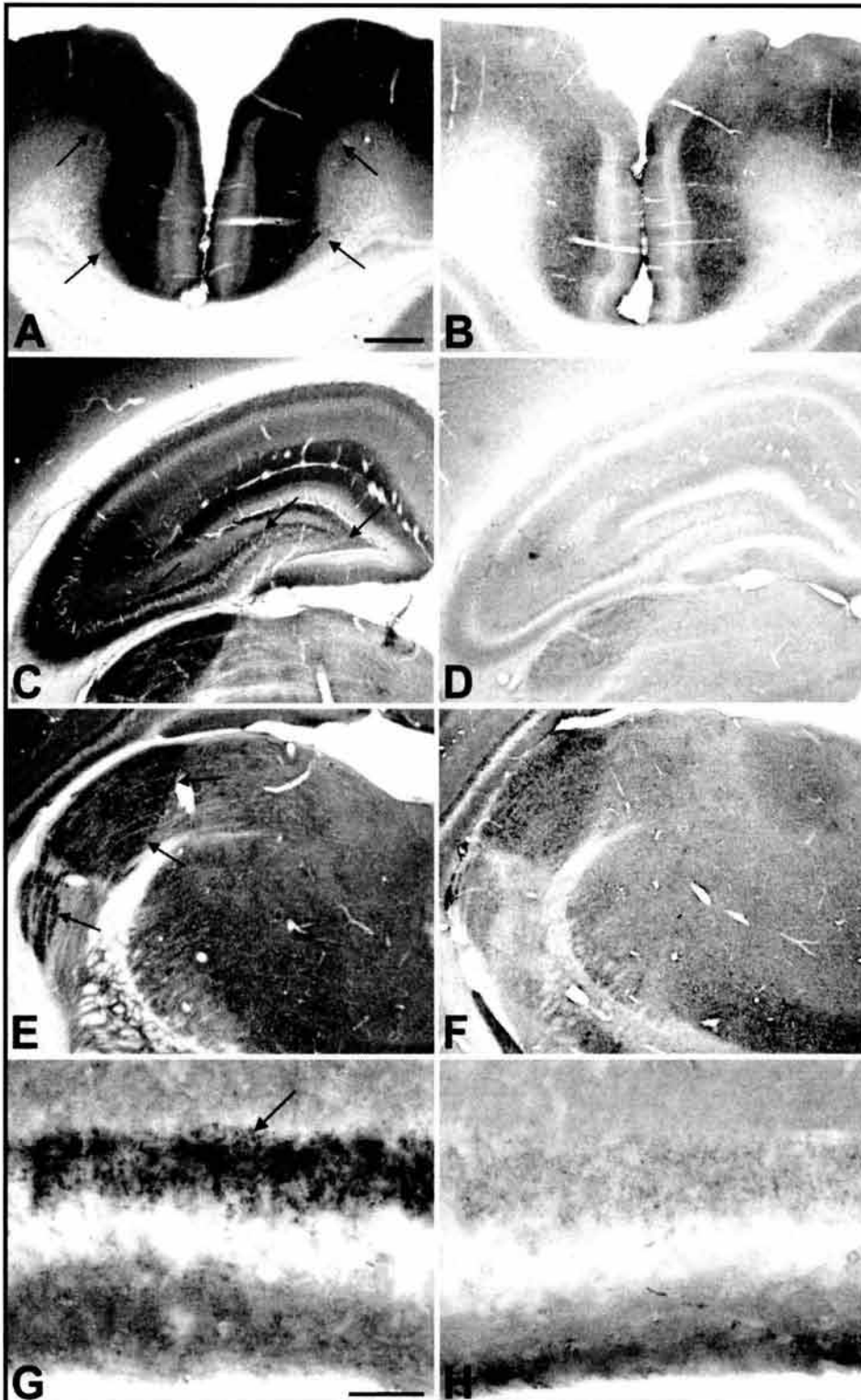


Figura 38. Inmunohistoquímica a sinapsina I. Fotomicrografías de cortes coronales (50 μm) de cerebro de ratas de 24 días tratadas con L-NAME del día 3 al 23 postnatal (**A, C, E y G**) y de controles (solución salina) (**B, D, F y H**). **A y B** corteza prefrontal; **C y D** hipocampo; **E y F** tálamo dorsal; **G y H** magnificación de la región CA3. En todos los cortes del grupo tratado de observa una disminución de la inmunorreactividad a sinapsina I. Las flechas indican áreas de intensa tinción. Barras: 350 μm (**A-F**); 50 μm (**G-H**).

DISCUSIÓN GENERAL

Como mencionamos anteriormente, esta tesis esta dividida en tres capítulos: en el primero se determinó la existencia y localización anatómica del óxido nítrico durante el desarrollo del sistema nervioso central del *Ambystoma mexicanum*, mediante el empleo de técnicas para la localización de la enzima que sintetiza al NO y su actividad enzimática, en tejido fijado: la histoquímica para la NADPH-d y la inmunohistoquímica para la nNOS (Capítulo I). En el segundo capítulo se describen estructuras del sistema nervioso periférico positivas a la NADPH-d/ nNOS: los neuromastos y el epitelio olfatorio. A partir de estos resultados, estudiamos la distribución anatómica de la NADPH-d/ nNOS en el epitelio olfatorio del axolotl en la etapa juvenil y de adulto (Capítulo II). En el tercero investigamos el efecto de la inhibición de la NOS con sus antagonistas L-NAME y L-NOARG durante el desarrollo y maduración del SNC y sobre la expresión de la proteína presináptica, la sinapsina I, que utilizamos como un marcador de la actividad y densidad sináptica (Capítulo III).

Distribución anatómica de la sintasa del óxido nítrico durante el desarrollo del sistema nervioso central del axolotl, *Ambystoma mexicanum*

La detección de la actividad a la NADPH-d y la inmunorreactividad a la nNOS inicia a partir del día 8 del desarrollo del SNC del *A. mexicanum*. Las fibras y neuronas marcadas se presentaron conforme al desarrollo de las estructuras cerebrales del axolotl. Se inicia en el rombencéfalo hasta la parte palial del telencéfalo, última región en desarrollarse y en presentar la marca (ver tabla VII). La actividad de la NADPH-d y la IR-NOS no se expresa durante la división celular o en el proceso de migración, pero si en el último periodo de desarrollo, cuando ocurre el establecimiento de conexiones. Esto mismo se reportó en mamíferos donde se observó que las primeras neuronas marcadas aparecen después de terminado el periodo de división celular durante la maduración, extensión de las terminales y sinaptogénesis (Bredt y Snyder, 1994; Alonso et al., 2000; López y González, 2002).

En el día 8 del desarrollo del SNC del *Ambystoma* se detectó la NADPH-d/nNOS en grupos de neuronas y fibras nerviosas en la parte medial lateral del rombencéfalo, donde se encuentra el núcleo reticular inferior (Herrick, 1948) y se describe como una zona relacionada con el control motor y del nado de la larva, desde etapas tempranas del desarrollo (McLean et al., 2000, 2001). La presencia de neuronas marcadas en esta etapa del desarrollo coincidió con los primeros movimientos de la larva dentro del huevo, por lo que posiblemente el NO participe en el control motor del nado como se ha sugerido en otro anfibios (McLean et al., 2000, 2001). En la rana *Xenopus laevis*, McLean y col.

(2000) reportan que durante el desarrollo del SNC de este anfibio, el primer grupo de neuronas positivas a la NADPH-d se localiza en la parte caudal del rombencéfalo y se describen como neuronas reticuloespinales relacionadas con el control del nado de la larva. La actividad eléctrica de estas neuronas cambia cuando se exponen a inhibidores del NO, como el L-NAME y el N(G)-nitro-L-arginina, ($0.5-5 \text{ mmol}^{-1}$) o a donadores del NO como el S-nitroso-N-acetilpenicilamina, $100-500 \mu\text{mol}^{-1}$, lo que confirma su participación en el control de las funciones motoras de la larva (McLean et al., 2000, 2001).

El NO inicia su expresión alrededor del día 17 de la gestación en la rata y en el día 8 del desarrollo larvario en el axolotl, junto con otros neuropéptidos y neurotransmisores que participan en el desarrollo y crecimiento del SNC. En la rata se reporta que la acetilcolina aparece el día 23, el GABA y las catecolaminas el día 16 (Kwong et al., 2000). El neuropéptido Y se identifica el día 13 de la gestación (Foster y Schultzberg, 1984), la somatostatina y sustancia P en el 14 (McGregor et al. 1982). Los péptidos neurohipofisarios, vasopresina y la oxitocina en el día 14 y 17 (Buijs et al., 1980), mientras que las fibras vasopresinérgicas aparecen inmunorreactivas en el día 16 (Boer et al., 1980; Buijs et al., 1980). Los péptidos de la familia de la proopiomelanocortina están presentes desde el día 15 de la gestación (Bayón et al., 1979b, Swaab y Martin, 1982). El factor estimulante de la liberación de la hormona luteinizante se identifica en el día 1 postnatal (McGregor et al., 1982) y el de la hormona tiroidea en el día 18 (Conklin et al., 1973). La neurotensina después del día 10 postnatal (Aperi et al., 1982). En el núcleo del tracto solitario que esta formado por una población mixta de células que contienen varios neurotransmisores (González et al., 1994; Truinhof et al., 1994) y neuropéptidos (Sánchez-Islas et al., 1999; Chartrel et al., 2002; Kozicz et al., 2002; Crespo et al., 2003; González et al., 2003; Haremaki et al., 2003, Hu et al., 2003; Nemeth, 2003). La inmunorreactividad a la nNOS aparece en etapas mas tempranas que otros neurotransmisores o neuropéptidos (González et al., 1994; Truinhof et al., 1994). En estudios anteriores hemos visto que en el núcleo reticular inferior en el *A. mexicanum* los péptidos opioides (leucina- y metionina-encefalina y octapéptido) aparecen el día 12 del desarrollo, cuatro días después de la NOS (Sánchez-Islas et al., 1999).

Los estudios de neurodesarrollo en mamíferos muestran patrones definidos de expresión de la NOS en diferentes núcleos cerebrales (Bredt y Snyder, 1994; Giulli et al., 1994; Vizzard et al., 1994; Samara et al., 1995; Tenório et al., 1995; Terada et al., 1996). Bredt y Snyder (1994) reportaron que en la etapa embrionaria 15 (E15) de la rata se expresa transitoriamente la NADPH-d en las neuronas de la corteza cerebral, en la etapa postnatal presenta un decremento significativo, la expresión se incrementa nuevamente en el adulto o cuando se produce una lesión

o daño cerebral. En otros vertebrados hay un aumento de la expresión durante el crecimiento y maduración neuronal; así como en la formación de vías neuronales (Fiallos-Estrada et al., 1993; Vizzard et al., 1993). En el *A. mexicanum*, las neuronas y fibras marcadas fueron en aumento hasta la etapa de adulto neoténico, sin mostrar ningún decremento o pérdida de la marca. Como en el axolotl, otros anfibios presentan un patrón similar de expresión de la NOS, lo que sugiere que este patrón sea característico de los anfibios (Guglielmotti y Fiorino, 1999; McLean et al., 2000; McLean y Sillar, 2001; Peunova et al., 2001; López y González, 2002; González et al., 2002; Moreno et al., 2002a,b).

En el tallo cerebral caudal de los amniotas (reptiles, aves y mamíferos), la actividad de la NADPH-d aparece antes que en la parte rostral o que en el cerebro anterior (Takemura et al., 1996; Terada et al., 1996; Iwase et al., 1998). Contrario a esto, en el pez teleosteo *Tilapia mariae*, el único vertebrado anamniota donde se estudio el patrón de expresión de la NADPH-d, se vio que este aparece en etapas tempranas en el telencéfalo y en varios núcleos del diencéfalo, mientras que en el tectum óptico y otros centros del tallo cerebral, la marca a la NADPH-d aparece mucho después (Villani, 1999), lo que señala algunas diferencias en el desarrollo del sistema nitrérgico entre amniotas y anamniotas (Moreno et al., 2002a,b). El patrón de expresión en el *A. mexicanum* y en otros anfibios urodelos (McLean et al., 2000, 2001; Moreno et al., 2002a,b) tiene más similitudes con los amniotas que con los peces, ya que las primeras células nitrérgicas se detectan en la parte caudal del rombencéfalo y posteriormente en las regiones más rostrales.

A partir del día 14 del desarrollo del axolotl inicia la eclosión de las larvas, lo cual conlleva cambios fisiológicos importantes. En esta etapa se observó un aumento de núcleos cerebrales con neuronas fuertemente marcadas (núcleo del trigémino, tegmentum, tálamo y núcleo estriamigadalino, ver tabla VI), lo que sugiere la participación del NO en los cambios fisiológicos relacionados con la eclosión. En otros vertebrados, el aumento de áreas cerebrales positivas a la NOS se correlaciona con etapas críticas del desarrollo, como en la eclosión en aves (Brüning, 1993; Rickard et al., 1994; Atoji, 2001), y en el nacimiento en los mamíferos (Matsumoto, 1993; Williams, 1994; Galea, 1995; Tenorio, 1995; Holtzman, 1996; Keilhoff, 1996; Layes, 1996; Takemura, 1996; Bertini y Bentivoglio, 1997). En los anfibios urodelos que presentan metamorfosis, como la salamandra *Pleurodeles waltl*, hay un cambio en la distribución de la NADPH-d/NOS y se observan nuevos núcleos cerebrales marcados durante este proceso biológico. Lo que sugiere que el NO tenga un papel durante el proceso de metamorfosis (González et al., 1996; González et al., 2003). El axolotl es un anfibio neoténico, llega a la madurez sexual en estado larvario, a los 10 meses de edad, la distribución de la NADPH-d/NOS se asemeja a la del adulto neoténico y a la distribución que se

reporta en otros anfibios adultos que si sufren metamorfosis. Esto sugiere que el sistema nitrérgico del axolotl es maduro, aunque el permanezca en estado larvario. No se ha estudiado si hay cambios en la distribución de la NADPH-d/NOS si se provocara experimentalmente la metamorfosis.

En las etapas tempranas del desarrollo del axolotl, en los núcleos amigdalino (NA_m) del fascículo medial telencefálico (NFMT) y del mesencefálico del trigémino, las fibras nerviosas marcadas tuvieron una densidad media. A los 10 meses del desarrollo, se observaron los fascículos y los tractos fuertemente marcados, particularmente los de los núcleos de los fascículos laterales y medios telencefálicos, el fascículo tegmental profundo y el tracto tegmental pedúncular. Este patrón de aumento progresivo se reportó en otros vertebrados (Derer y Derer, 1993; González et al., 1996; Moreno et al., 2002a,b; González et al., 2003). En este sentido, la expresión de la NADPH-d se correlaciona con el tiempo de innervación de diferentes áreas cerebrales (Derer y Derer, 1993; Bredt y Snyder, 1994; Williams, 1994). Como en el caso de las fibras nigro-estriatales (Derer y Derer, 1993), las musgosas en el cerebelo, las conexiones tálamo-cortical (Bredt y Snyder, 1994), la retino-tectal (Williams, 1994) y en las en las neuronas del tálamo y tectum (Williams et al., 1994; Bertini y Bentivoglio, 1997). Por lo que se sugiere que el NO intervenga en el refinamiento y maduración de las conexiones cerebrales.

Está reportado que la actividad a la NADPH-d y la inmunorreactividad a la nNOS no colocalizan en algunos núcleos cerebrales como son: en el bulbo olfatorio, el núcleo principal olfatorio, la mucosa olfatoria y la glándula adrenal de la rata adulta (Hope et al., 1991; Kidd et al., 1995). En la mucosa olfatoria del axolotl si hubo coexistencia de las dos marcas en las neuronas receptoras olfatorias, lo que no se había reportado en otros vertebrados (Sánchez-Islas y León-Olea, 2001). En los experimentos con cortes seriados, se observó claramente la presencia de ambas marcas en los mismos núcleos cerebrales durante el neurodesarrollo del axolotl. Esto sugiere que la actividad de la NADPH-d efectivamente corresponde a la nNOS (Snyder, 1992; Snyder y Bredt, 1992). Se reportó la presencia de la NOS endotelial en neuronas del hipotálamo y en otras regiones cerebrales, que producen actividad de la NADPH-d, sin embargo estas no tienen inmunorreactividad a la nNOS (Dinerman et al., 1994). En los únicos núcleos donde no se encontró esta colocalización fueron: el bulbo olfatorio y en el núcleo principal olfatorio. Estos núcleos presentan actividad a la NADPH-d pero no IR-nNOS, igual que como se reportó para la rata.

Estructuras del sistema nervioso periférico positivas a la NADPH-d y a la nNOS

Sistema de la línea lateral

La presencia del NADPH-d/nNOS se observó en otras estructuras del SNP como son: en los neuromastos, en las neuronas receptoras olfatorias del epitelio olfatorio (ver fig. 20) y en los fotorreceptores de la retina (no se muestra en esta tesis). Los neuromastos son órganos sensoriales que forman parte de la línea lateral del axolotl, se distribuyen en la cabeza y en la parte lateral del cuerpo. A partir del día 10 del desarrollo, las células ciliadas de los neuromastos presentaron una marca intensa, la cual se mantiene hasta el adulto. La inmunorreactividad a la nNOS y la actividad a la NADPH-d coexisten. No se tiene información de la presencia de NO en estos órganos en otras especies de animales. Se sabe que estas estructuras son receptores sensoriales que transmiten la información del medio que rodea al animal, como concentración de sales, posición, electrosección, etc. (Northcutt, 1990). Por lo que la presencia de NO en estas estructuras puede sugerir la participación de esta molécula en procesos de la transducción sensorial como se reportó en otros sistemas sensoriales como el olfatorio y el vestibular (Breer et al., 1993; Bredt y Snyder, 1994, Davis et al., 1991; Flores et al., 1996). Falta por determinar la participación de esta molécula en la transducción de estas señales en el sistema de la línea lateral y estudiar su importancia en la comunicación del axolotl con su medio ambiente.

Sistema olfatorio

En el epitelio olfatorio de la cavidad nasal se detectó actividad a la NADPH-d e inmunorreactividad a la nNOS a partir del día 10 del desarrollo. La marca se localizó principalmente en las neuronas receptoras olfatorias (NRO), en los complejos mucociliar/microviliar y en las células basales. En las NRO, la actividad a la NADPH-d se observa en el soma, dendritas y el axón. La IR-nNOS está principalmente en las dendritas, en los botones dendríticos, en sus conos axónicos y en algunos somas. En estas estructuras observamos que en el día 10, la marca fue tenue y posteriormente se incrementó hasta el décimo mes de desarrollo y se conserva hasta en el adulto neotético como una marca fuerte (Sánchez-Islas y León Olea, 2001). En otros vertebrados durante el desarrollo coexisten las dos marcas en las células basales, pero en el adulto, la inmunorreactividad a la nNOS desaparece (Bredt y Snyder, 1994). Con la axotomía del nervio olfatorio o la lesión del epitelio nasal en la rata, la inmunorreactividad vuelve, mientras se regenera la mucosa olfatoria. La axotomía olfatoria en el axolotl provoca la pérdida de la marca por degeneración de las NRO, a las 2 semanas posteriores al daño hay una marca fuerte en las células basales que son las células que dan

origen a las NRO (Barber y Raisman 1978; Wilson y Raisman 1980), por lo que sugerimos la participación del NO en el desarrollo y diferenciación de las neuronas receptoras olfatorias (Roskams et al., 1994; Sánchez-Islas y León Olea, 2001). El NO participa en la transducción de la señal olfatoria, la cual se realiza en los microcilios de las neuronas receptoras olfatorias, por lo que desde etapas tempranas del desarrollo del *Ambystoma*, el NO puede participar en esta función como se sugerido en otros vertebrados (Davis et al., 1991; Breer et al., 1992; 1993; Hanazawa et al., 1993; Lischka y Schild 1993; Bredt y Snyder, 1994; Kulkarni et al., 1994; DellaCorte et al., 1995; Zielinski et al., 1996). Sin embargo, la colocalización de NADPH-d e IR-nNOS en las NRO no se ha encontrado en otros vertebrados, únicamente Zielinski y col. (1996) reportaron esta colocalización en la larva de la lamprea *Petromyzon marinus*. En otras especies como la rata, bagre, o el humano, se reportó la presencia de NADPH-d en las NRO, pero no la IR-nNOS (Kulkarni et al., 1994; DellaCorte et al., 1995). Existen varios factores que pueden fundamentar la falta de colocalización: (1) Las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas empleadas por diferentes investigadores pueden diferir en la especificidad, sensibilidad, y/o mostrar particularidades. (2) Las neuronas olfatorias maduras pueden expresar isoformas ligeramente diferentes a la nNOS contra la cual la especificidad del anticuerpo fue desarrollado y consecuentemente no se detectan. (3) La marca histoquímica de la NADPH-d obtenida en algunas especies sería resultado de la acción de una enzima oxidorreductasa diferente de la NOS. Esto ocurre cuando el tejido no se fijó con la concentración de paraformaldehído y el tiempo de postfijación adecuados. La fijación con paraformaldehído inactiva todas las enzimas dependientes de la NADPH-d excepto a la NOS (Dawson et al., 1991, Bredt y Snyder 1992, Matsumoto et al., 1993, Yamamoto et al., 1993). Es interesante mencionar que en el axolotl usamos diferentes diluciones para la inmunohistoquímica en el tejido olfatorio y en el cerebro (1:100, 1:500). Estos datos sugieren una sensibilidad diferente del anticuerpo o una concentración baja de la enzima en el tejido olfatorio. No obstante, hay evidencias bioquímicas y fisiológicas (DellaCorte et al., 1995) que muestran que el NO este presente en el epitelio olfatorio de varias especies y que esta molécula juega un papel en la transducción olfatoria. Así, los estudios electrofisiológicos en los receptores de membrana de las NRO del *Xenopus laevis* (Linschka y Schild, 1993), tanto como la estimulación de los cilios de tejido olfatorio aislado de rata y bagre (Breer et al., 1992; Breer y Shepherd, 1993) con altas concentraciones de odorantes, inducen un incremento rápido de los niveles AMPc o IP3, además de un retraso y una elevación sostenida de la concentración de GMPc. La respuesta de GMPc inducida por odorantes se bloquea por L-NG-nitro-arginina, un inhibidor selectivo de la síntesis del NO, así como la hemoglobina, la cual une e inactiva eficientemente al NO. En el registro electrofatográfico (REO) del epitelio nasal de la larva de lamprea, la administración de L-arginina, el precursor del NO, induce una potente respuesta en el registro del REO, mientras que la aplicación del inhibidor de la NOS, Nw-n-L-arginina, causa un notable decremento en la respuesta (Zielinski et al., 1996). Lo anterior sugiere una clara

modulación de la respuesta olfatoria mediada por el NO. El hecho de que la tinción a la NADPH-d e IR-nNOS se encuentren en dos especies en estado larvario, como el axolotl (presente datos) y la larva de la lamprea (Zielinski et al., 1996), sugiere que el estado de desarrollo puede ser un factor que contribuye a la detección de ambas marcas. Las técnicas de inmunoblot y Western blot revelaron que los periodos de diferenciación (diferenciación y regeneración) coinciden con un incremento del ARNm y de la expresión de la NOS (Roskams et al., 1994). Nosotros encontramos que en el lado axotomizado del axolotl, el EO exhibe un incremento de las células basales positivas a la NADPH-d y nNOS a las dos semanas de postaxotomía (Figs. 29 A y B). La bulbectomía y la axotomía del nervio olfatorio producen degeneración retrograda de las NRO en el epitelio nasal. Cuando las aferentes del bulbo olfatorio se seccionan, sus axones se degeneran y muere la neurona (Graziadei y DeHan, 1973; Margolis et al., 1974; Graziadei y Graziadei, 1979; Graziadei y Okano, 1979; Graziadei et al., 1980; Graziadei y Monti Graziadei, 1980; Wang y Halpern, 1982; Doucette et al., 1983). Nosotros realizamos la axotomía olfatoria para confirmar que la marca estuviera presente en las NRO. Los resultados obtenidos confirman este hecho. A las dos semanas después de la axotomía, observamos un decremento importante en la IR-nNOS y la tinción de la NADPH-d en la cavidad nasal y en el órgano vomeronasal. La marca está en las células basales y NRO inmaduras. A las 5 semanas después de la axotomía, la marca se pierde totalmente. Una posible explicación para este último hallazgo es que después de la axotomía el epitelio comienza a regenerar (a las 2 semanas) pero en un momento de este proceso es necesaria la presencia de su órgano blanco para el establecimiento de contactos. En ausencia de este, la regeneración celular finalmente cesa y degeneran las NRO (Schwob et al., 1992; Roskams et al., 1994).

También se marcan las fibras nerviosas de los vasos sanguíneos y de las glándulas de Bowman del EO, como se reportó en otras especies (Hanazawa et al., 1994; Sakai et al., 1996; Jeon et al., 1997). La presencia del NO en los vasos sanguíneos sugiere posiblemente que esta molécula puede participar en la regulación del flujo sanguíneo del epitelio nasal de axolotl. Esta función se le ha atribuido al NO en la cavidad nasal de otras especies (Hanazawa et al., 1993; Kulkarni et al., 1994; DellaCorte et al., 1995; Zielinski et al., 1996). Las fibras que forman una red alrededor de las células secretoras de las glándulas de Bowman fueron positivas a la NADPH-d. Estas glándulas secretan un suero rico en glicoproteínas a la superficie del epitelio olfatorio (Getchell y Getchell 1984). Jeon y col. (1997) describió en la rata que las fibras positivas a la NADPH-d que rodean los vasos sanguíneos del epitelio nasal y las glándulas de Bowman se originan en el ganglio esfenopalatino. Este ganglio contiene neuronas colinérgicas, por lo cual el NO colocalizaría con acetilcolina y contribuiría al control vasomotor y secretomotor en este tejido.

En el epitelio respiratorio de la cavidad principal, se observaron unas células pequeñas que mostraron tinción a la NADPH-d e IR-nNOS (Fig. 25C, Fig. 27 A, B). Estas células no se han descrito en otros estudios anatómicos de la cavidad nasal del axolotl. Faltan estudios que demuestren la naturaleza y función de estas células positivas al NO en el axolotl.

Efecto de la inhibición de la NOS durante el desarrollo del sistema nervioso central del axolotl

La inhibición de la NOS por sus antagonistas L-NAME y L-NOARG, administrados desde la etapa de neurulación (E 56 h) hasta los 30 días del desarrollo larvario no produjo alteraciones macroscópicas anatómicas o neuroanatómicas evidentes en el SNC del *A. mexicanum*. La mortalidad de las larvas aumentada con L-NAME tiene una mortalidad más alta (31 %) que las tratadas con L-NOARG (23 %) comparadas con el control (15 %) (Fig. 34) y se presenta principalmente en los primeros días de tratamiento, posteriormente la mortalidad baja (Fig. 35). En los animales control entre la primera división celular y el inicio de la neurulación hay una mortalidad de 15 %. En estos experimentos empleamos un protocolo donde se aplicaron los inhibidores disueltos en la solución de Steinberg en la cual estaban inmersos los huevos. Cuando se inhibe a la NOS con L-NAME, la actividad a la NADPH-d en las fibras y neuronas decrece considerablemente, no presentando tinción o una tinción escasa (Virgili et al., 1999). Los cortes del cerebro de las larvas tratadas y procesadas para la NADPH-d no presentaron cambios significativos en la tinción comparados con el control. Por lo que pensamos que las larvas más susceptibles al tratamiento mueren y en las otras larvas no se logró la inhibición de la NOS.

Efecto de la inhibición del óxido nítrico durante la maduración sináptica en la expresión de la sinapsina I en el cerebro de la rata

En los mamíferos como en el anfibio *A. mexicanum*, la inhibición de la nNOS no produce alteraciones neuroanatómicas evidentes (Yallampalli y Garfield, 1993; Huang et al., 1993; Dinerman et al., 1994; Nelson et al., 1995). No obstante otros estudios revelan que la inhibición del NO produce efectos más puntuales, como la falta de expresión de proteínas de maduración neuronal como la cat-305, alteraciones en la proliferación, crecimiento y sinaptogénesis neuronal (Kalb y Agostini, 1993; Wu et al., 1994; Finney y Shatz, 1998; Peunova et al., 2001). Es por lo que decidimos estudiar el efecto de la inhibición de la NOS sobre la expresión de las proteínas sinapsinas. Varios grupos de investigación usan a las sinapsinas como un índice para estudiar la

densidad sináptica, lo cual puede relacionarse con la pérdida o ganancia de funciones (Melloni y DeGennaro, 1994; Suemaru et al., 2000; Ferreira y Rapoport, 2002). Esto está basado en las siguientes evidencias: 1) las sinapsinas son una de las familias de proteínas presinápticas más abundantes en el cerebro (Goelz et al., 1981; Ueda et al., 1981; Browning et al., 1987). 2) Se expresan únicamente en las neuronas y se localizan en los compartimentos presinápticos de las sinapsis (De Camilli et al., 1983; De Camilli et al., 1987; De Camilli et al., 1990; Finger et al., 1990; Greengard et al., 1993). 3) Durante el desarrollo del sistema nervioso, la aparición de la sinapsina I en el neuropilo correlaciona temporalmente y topográficamente con la sinaptogénesis (Lohmann et al., 1978; DeGennaro et al., 1983; Mason, 1986; De Camilli 1988; Moore y Bernstein 1989; Melloni y DeGennaro, 1994; Ferreira et al., 2000). 4) En los estudios de expresión sináptica, *in situ* y en cultivo neuronal, revelan que el incremento en los niveles de la sinapsina I y sinapsina II es paralelo al establecimiento de contactos sinápticos en diferentes áreas cerebrales (Lohmann et al., 1978; Melloni y DeGennaro, 1994; Ferreira et al., 2000). 5) La inyección de sinapsina I o sinapsina II dentro de las neuronas espinales de embriones de *Xenopus* dan como resultado la aceleración del desarrollo morfológico y funcional de sinapsis neuromusculares (Lu 1992; Schaeffer 1994; Valtorta et al., 1995). 6) En los ratones que carecen de sinapsina I, hay un decremento en el tamaño de las terminales y en el número de las vesículas sinápticas por terminal (Chin et al., 1995). Así, Melloni y DeGennaro, (1995) sugieren que la inmunorreactividad de sinapsina I en el cerebro puede usarse como un claro indicador del mantenimiento/establecimiento y/o pérdida/recuperación de sinapsis funcionales en el SNC.

Basado en estos estudios, nosotros utilizamos a las sinapsinas como marcadores de la densidad sináptica. Como las sinapsinas, se demostró que el NO participa en la sinaptogénesis (Wu et al., 1994, Chin et al., 1995, Chen et al., 2003, Leimert et al., 2003), regulación de la liberación de neurotransmisores (Hanbauer et al., 1992; Zhu y Luo, 1992; Dawson y Snyder, 1994; Meffert et al., 1994; Montague et al., 1994; Meffert et al., 1996) y plasticidad sináptica (Holscher, 1997). Esta similitud de funciones sugiere una relación cercana entre el NO y las sinapsinas. Las reacciones del NO con su blanco neuronal son parcialmente determinadas por la localización celular de la nNOS (Kornau et al., 1995; Bredt, 1996; Brenman et al., 1996; Sattler et al., 1999; Jaffrey et al., 2002). Jeffrey y col. (2002), reportaron que la proteína CAPON que está en la presinápsis une a la nNOS y a la sinapsina para formar la tríada sinapsina/CAPON/nNOS, esto provee evidencia de la relación funcional entre estas proteínas. La falta de la sinapsina I origina modificaciones en la localización celular de la nNOS y del CAPON, lo cual afecta las funciones celulares de este complejo ternario. En la etapa postnatal temprana que es un período de sinaptogénesis y maduración cerebral hay una alta expresión de sinapsinas y de nNOS en varias

áreas del cerebro (Lohmann et al., 1978; Moore y Bernstein, 1989; Melloni y DeGennaro, 1994; Bravo et al., 1997; Ferreira 2000; Leimert y Blottner, 2003). Por esto nos interesó saber que efecto tenía la inhibición de la NOS sobre la expresión de las sinapsinas en la etapa postnatal temprana. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de la NOS en la etapa postnatal (día 3 al 23) en la rata induce un decremento significativo de la inmunorreactividad a la sinapsina I en todas las regiones del cerebro. En todas las áreas hipocámpales hubo un decremento importante de la densidad de $19 \pm 8 \%$, en el striatum oriens de CA1 de un $41 \pm 7 \%$ del valor del control, en el striatum lucidum de CA3b (Tabla X, Fig. 36E). Estas subregiones son ricas en esta proteína, y tienen una relación funcional en los procesos de aprendizaje y memoria (Markowitsch, 1999). Nuestros resultados sugieren que la inhibición de la NOS puede tener un efecto en la formación sináptica, ya que hay un decremento significativo en su densidad. Este decremento puede reflejar tanto los efectos de la disfunción local de la actividad de la NOS como posibles efectos secundarios de alteraciones funcionales debido a la inhibición de las diferentes isoformas de la NOS a nivel periférico.

Por otro lado, el NO a nivel sináptico actúa como un neurotransmisor retrogrado para mantener la actividad en la neurona presináptica, a pesar de que su síntesis ocurre en la neurona postsináptica. El NO en la neurona presináptica facilita la liberación de neurotransmisores (Hanbauer et al., 1992; Zhu y Luo, 1992; Dawson y Snyder 1994; Meffert et al., 1994; Montague, 1994; Meffert, 1996). Cuando la neurona presináptica está inactiva, las sinapsinas unen a las vesículas sinápticas a la actina del citoesqueleto (fracción de reserva), pero cuando la neurona está activada, las sinapsinas se fosforilan y liberan a las vesículas, las cuales se desplazan hacia la zona activa de la membrana presináptica (Greengard et al., 1993; Meffert, 1996). Para formar la tríada CAPON/sinapsina/NO, las sinapsinas deben de estar fosforiladas. Esta tríada mantiene a la nNOS disponible en la presinápsis (Jaffrey et al., 2002). La ausencia de NO no únicamente afecta a las sinapsinas en las vesículas sinápticas, sino que modifica a otras proteínas sinápticas (n-sec1, syntaxina 1a, VAMP 2, SNAP-25) involucradas en el reclutamiento y la fusión de las vesículas sinápticas (Meffert et al., 1996), además de inhibir la liberación de neurotransmisores independiente de calcio (Meffert et al., 1994). Esto sugiere que las alteraciones fisiológicas debidas a la ausencia del NO, las cuales son similares a las originadas por la deficiencia de sinapsinas, se deben a la falta de disponibilidad de la enzima en la terminal sináptica y afectan la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica durante el desarrollo.

La inhibición crónica origina la falta de tinción o una tinción muy escasa, reflejo de la actividad enzimática de la nNOS (Nelson et al., 1995). La inhibición con L-NAME afecta de manera distinta a las isoenzimas de la NOS, siendo las formas endotelial e inducible afectadas en menor grado que la NOS neuronal que es la mas afectada (Moncada et al., 1991). Virgili y col. (1999), reportan que con este tratamiento de L-NAME (60 mg/kg/día, subdérmico y aplicado postnatalmente) hay una completa inhibición de la actividad catalítica que se mantiene durante toda la administración, pero a los cuatro días después de terminado el tratamiento, la actividad de la enzima se recupera. Con este mismo tratamiento, nosotros no encontramos alguna alteración neuromorfológica ni mortalidad aumentada. Prickaerts y col. (1998), reportan que con una dosis subdérmica de 25 mg/kg/día de L-NAME aplicada en el día postnatal 1 (P1), origina una alta mortalidad durante la primera semana después del nacimiento (P1-P3). Nosotros iniciamos el tratamiento con L-NAME (60 mg/kg/día) en el día 3 y, aunque la dosis fue más alta, el 100 % de nuestros animales sobrevivieron. Es importante mencionar que aunque no hicimos experimentos específicos para probar la conducta motora, las ratas tratadas comparadas con las controles tuvieron un comportamiento motor diferente durante el tratamiento, como lo reportan otros autores (Virgili et al., 1999). Prickaerts y col. (1998), reportan un incremento en la actividad motora en las crías de ratas probadas en campo abierto como resultado del tratamiento con L-NAME.

Nuestros resultados proveen evidencias morfológicas de que la carencia de NO induce una reducción de la densidad sináptica y una deficiencia de sinapsinas. Lo que sugiere que la disminución de sinapsinas resultado de la ausencia del NO puede alterar aquellas funciones cerebrales que dependen de la formación de conexiones sinápticas, tales como el aprendizaje y la memoria.

CONCLUSIONES

Distribución de la NADPH-d y la nNOS en el desarrollo del SNC del *Ambystoma mexicanum*

Nuestros resultados demostraron que la actividad a la NADPH-d y la inmunorreactividad a la nNOS (IR-nNOS) se detecta en etapas tempranas del desarrollo (día 8 embrionario) del SNC del *A. mexicanum*, tal y como se reporta en otros vertebrados. Ambas marcas no se expresan durante la división celular o en el proceso de migración, pero si en el último periodo de desarrollo, cuando ocurre el establecimiento de conexiones, lo que sugiere que el NO participa en el desarrollo del SNC del *A. mexicanum*. La distribución de la NADPH-d/NOS en la etapa larvaria juvenil se asemeja a la del adulto neoténico y a la distribución que se reporta en otros anfibios adultos que si sufren metamorfosis. Esto sugiere que el sistema nitrérgico del axolotl es maduro, aunque permanezca en estado larvario.

Distribución de la NADPH-d y la nNOS en el desarrollo de los neuromastos y del epitelio nasal del *A. mexicanum*

La actividad a la NADPH-d y la IR-nNOS se detectó en etapas tempranas del desarrollo (día 10 embrionario) del epitelio nasal del *A. mexicanum*, lo que sugiere una posible participación del NO en desarrollo y crecimiento del epitelio nasal, además de estar involucrado en diferentes funciones fisiológicas de la cavidad nasal.

La presencia y localización de la actividad a la NADPH-d y la IR-nNOS se detectó desde etapas tempranas del desarrollo (día 10 embrionario) en los neuromastos de la línea lateral del *A. mexicanum*, lo sugiere una posible participación del NO en la transducción sensorial, como se ha reportado para el sistema olfatorio.

Distribución de la NADPH-d y la nNOS en el epitelio nasal en el axolotl juvenil y el adulto neoténico

Nuestros resultados mostraron la presencia de una tinción intensa a la NADPH-d e IR-nNOS en las neuronas receptoras olfatorias (NRO) del epitelio nasal de la cavidad principal y en el órgano vomeronasal del axolotl, tanto en la etapa juvenil como la de adulto neoténico. La inmunorreactividad a la nNOS se localizó principalmente en las dendritas de las NRO y en los complejos mucociliar/microviliar, en la lámina propia de las arteriolas y en las células secretoras y del conducto de las glándulas de Bowman. De este modo, los resultados sugieren que el NO

puede estar involucrado en varias funciones fisiológicas en la cavidad nasal del *A. mexicanum*. Estas funciones parecen incluir la transducción de la señal olfatoria, regulación del flujo sanguíneo, y modulación de la secreción de las glándulas de Bowman. Además, el NO puede jugar un papel en el desarrollo de las NRO.

Inhibición del óxido nítrico durante el desarrollo del cerebro del axolotl, *A. mexicanum*

Con el procedimiento utilizado para inhibir a la NOS con L-NOARG y L-NAME, desde el día 8 del desarrollo embrionario hasta el 30 del desarrollo larvario del axolotl, no se presentaron alteraciones macroscópicas anatómicas, ni cambios en la tinción a la NADPH-d e inmunorreactividad a la sinapsina I en el cerebro de las larvas. Únicamente se presentó una alta mortalidad en las larvas tratadas con L-NAME. Por lo que nuestros resultados sugieren que hay larvas más susceptibles a la inhibición que mueren y las otras no se afectan.

Inhibición del óxido nítrico durante la maduración sináptica en la expresión de la sinapsina I en el cerebro de la rata

Nuestro estudio provee evidencias morfológicas que demuestran que la falta del NO provoca una reducción de la densidad sináptica y una deficiencia de sinapsinas. De tal manera, se puede sugerir que la falta de sinapsinas, resultado de la ausencia del NO, alterará funciones cerebrales que dependen de la formación de conexiones sinápticas, tales como el aprendizaje y la memoria.

Referencias

1. Alonso J.R., Arévalo R., Weruaga E., Porteros A., Briñón J.G., Aijón J. Comparative and Development neuroanatomical aspect of the NO system. En *Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System*. Ed. Steinbusch H.W.M., De Vente J., Vincent, S.R. Cap III, pp.51-110. Amsterdam: Elsevier, 2000.
2. Angotzi A.R., Hirano J., Vallerga S., Djamgoz M.B. Role of nitric oxide in control of light adaptive cone photomechanical movements in retinas of lower vertebrates: a comparative species study. **Nitric Oxide**. **6:200-4, 2002**.
3. Asanuma M., Miyazaki I., Tsuji T., Ogawa N. New aspects of neuroprotective effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**. **23:111-9, 2003**.
4. Atoji Y., Yamamoto Y., Suzuki Y. Distribution of NADPH diaphorase-containing neurons in the pigeon central nervous system. **J. Chem. Neuroanat.** **21:1-22, 2001**.
5. Badawy G., Reinecke M. Ontogeny of the VIP system in the gastro-intestinal tract of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*: successive appearance of co-existing PACAP and NOS. **Anat. Embryol. (Berl)**. **206:319-25, 2003**. Epub 2003 Feb 07.
6. Barber P.C., Raisman G. Inhibition by puromycin of transneuronal transport in the mouse accessory olfactory bulb. **Brain Res.** **152:303-11, 1978**.
7. Bertini G., Bentivoglio M. Nitric oxide synthase in the adult and developing thalamus: histochemical and immunohistochemical study in the rat. **J. Comp. Neurol.** **388:89-105, 1997**.
8. Bicker G. NO news from insect brains. **Trends Neurosci.** **21, 349-355, 1998**.
9. Bicker G. Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems. **Cell Tissue Res.** **303:137-46, 2001a**.
10. Bicker G. Nitric oxide: an unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroïd insect. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** **48:100-10, 2001b**.
11. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.** **2:907-16, 2001**.
12. Bordieri L., Persichini T., Venturini G., Cioni C. Expression of nitric oxide synthase in the preoptic-hypothalamo-hypophyseal system of the teleost *Oreochromis niloticus*. **Brain Behav. Evol.** **62:43-55, 2003**.
13. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. **Cell Mol. Life Sci.** **55:1015-28, 1999**.
14. Bravo H., Inzunza O., Fernández V., Sanhueza M. Distribution of NADPH-d positive neurons during postnatal development of the rat somatosensory cortex correlates with gradients of neurogenesis and development. **Neurosci. Lett.** **234:103-106, 1997**.
15. Brecht D.S., Snyder S.H. Nitric oxide mediated glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **86:9030-9033, 1989**.
16. Brecht D.S., Snyder S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **87:682-685, 1990**.
17. Brecht D.S., Glatt C.E., Hang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M., Snyder S.H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. **Neuron.** **7:615-24, 1991**.
18. Brecht D.S., Snyder S.H. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. **Neuron.** **13:301-313, 1994**.
19. Brecht D.S. Targeting nitric oxide to its targets. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **211:41-8, 1996**.
20. Breer H., Klem T., Boekhoff I. Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system. **Neuroreport.** **3:1030-1032, 1992**.
21. Breer H., Shepherd G.M. Implication of the NO/cGMP system for olfaction. **Trends Neurosci.** **16:5-9, 1993**.
22. Brenman J.E., Chao D.S., Gee S.H., McGee A.W., Craven S.E., Santillano D.R., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M.F., Froehner S.C., Brecht D.S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell.** **84:757-67, 1996**.
23. Broillet M.C., Firestein S. Gaseous second messengers in vertebrate olfaction. **J. Neurobiol.** **30, 49-57, 1996**.
24. Browning M.D., Huang C.K., Greengard P. Similarities between protein IIIa and protein IIIb, two prominent synaptic vesicle-associated phosphoproteins. **J. Neurosci.** **7:847-53, 1987**.
25. Brüning G. Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. **J. Comp. Neurol.** **334: 192-208, 1993**.

26. Brüning G., Wiese S., Mayer B. Comparative localization of nitric oxide synthase in the brain of the turtle *Psuedemys scripta elegans*. **J. Comp. Neurol.** **348:183-206, 1994.**
27. Brüning G., Katzbach R., Mayer B. Histochemical and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. **J. Comp. Neurol.** **358: 353–382, 1995.**
28. Brüning G., Mayer B. Localization of nitric oxide synthase in the brain of the frog, *Xenopus laevis*. **Brain Res.** **741: 331–343, 1996.**
29. Buhimschi I., Yallampalli C., Chwalisz K., Garfield R.E. Pre-eclampsia-like conditions produced by nitric oxide inhibition: effects of L-arginine, D-arginine and steroid hormones. **Hum Reprod.** **10:2723-30, 1995.**
30. Busse R., Mulsch A.. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS Lett.** **265:133-6, 1990.**
31. Buzzi M.G., Tassorelli C., Nappi G. Peripheral and central activation of trigeminal pain pathways in migraine: data from experimental animal models. **Cephalalgia.** **23 Suppl 1:1-4, 2003.**
32. Caggiano M., Kauer J.S., Hunter D.D. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: A lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. **Neuron.** **13: 339–352, 1994.**
33. Cameron H.A., Hazel T.G., McKay R.D. Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. **J. Neurobiol.** **36:287-306, 1998.**
34. Cao L., Eldred W.D. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in turtle retina: electron immunocytochemistry. **Vis. Neurosci.** **18:949-60, 2001**
35. Chartrel N., Dujardin C., Leprince J., Desrues L., Tonon M.C., Cellier E., Cosette P., Jouenne T., Simonnet G., Vaudry H. Isolation, characterization, and distribution of a novel neuropeptide, Rana RFamide (R-RFa), in the brain of the European green frog *Rana esculenta*. **J. Comp. Neurol.** **448:111-27, 2002.**
36. Chen J., Zhang Z.G., Li Y., Wang Y., Wang L., Jiang H., Zhang C., Lu M., Katakowski M., Feldkamp C.S., Chopp M. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. **Ann. Neurol.** **53:743-51, 2003.**
37. Chin S., Li L., Ferreira A., Kosik S., Greengard P. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **92:9230-9234, 1995.**
38. Cimini V. Neuropeptides in anterior pituitary development. **Int. J. Dev. Neurosci.** **21:291-301, 2003.**
39. Colasanti M., Venturini G. Nitric oxide in invertebrates. **Mol. Neurobiol.** **17, 157–174, 1998.**
40. Coleman, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int. Immunopharmacol.** **1:1397-406, 2001.**
41. Coons A.H. Labelled antigens and antibodies. **Annu. Rev. Microbiol.** **8:333-52, 1954.**
42. Contestabile A., Monti B., Contestabile A., Ciani E. Brain nitric oxide and its dual role in neurodegeneration/neuroprotection: understanding molecular mechanisms to devise drug approaches. **Curr. Med. Chem.** **10:2147-74, 2003.**
44. Crespo M., Moreno N., López J.M., González A. Comparative analysis of neuropeptide FF-like immunoreactivity in the brain of anuran (*Rana perezi*, *Xenopus laevis*) and urodele (*Pleurodeles waltl*) amphibians. **J. Chem. Neuroanat.** **25:53-71, 2003.**
45. Crow J.P., Beckman J.S. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **196:57-73, 1995.**
46. Czlonkowska A., Kurkowska-Jastrzebska I., Czlonkowski A., Peter D., Stefano G.B. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - a potential role for microglia and nitric oxide. **Med. Sci. Monit.** **8:RA165-77, 2002.**
47. Das U.N. Can memory be improved? A discussion on the role of ras, GABA, acetylcholine, NO, insulin, TNF-alpha, and long-chain polyunsaturated fatty acids in memory formation and consolidation. **Brain Dev.** **25:251-61, 2003.**
48. Davies S. Nitric oxide signalling in insects. **Insect Biochem. Mol. Biol.** **30:1123-38, 2000.**
49. Davis, B.J. NADPH-diaphorase activity in the olfactory system of the hamster and rat. **J. Comp. Neurol.** **314: 493–511, 1991.**
50. Davis B.J. NADPH-diaphorase activity in the olfactory system of the hamster and rat. **J. Comp. Neurol.** **314: 493–511, 1991.**
51. Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H. Nitric Oxide synthase and neural NADPH-diaphorase are identical in the brain and peripheral tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **88: 7797-7801, 1991.**
52. Dawson T.M., Dawson V. L., Snyder S. H. A novel neuronal messenger in brain: the free radical, nitric oxide. **Ann. Neurol.** **32: 297-311, 1992.**

53. Dawson M., Snyder H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.** 14: 5147-5159, 1994.
54. Dawson V.L., Dawson T.M. Nitric oxide in neurodegeneration. **Prog. Brain Res.**118:215-29, 1998.
55. De Camilli P., Harris M. Jr, Huttner B., Greengard P. Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. **J. Cell Biol.** 96:1355-73, 1983.
56. De Camilli P., Navone F. Regulated secretory pathways of neurons and their relation to the regulated secretory pathway of endocrine cells. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 493:461-79,1987.
57. De Camilli P., Vitadello M., Canevini M.P., Zanoni R., Jahn R., Gorio A. The synaptic vesicle proteins synapsin I and synaptophysin (protein P38) are concentrated both in efferent and afferent nerve endings of the skeletal muscle. **J. Neurosci.** 8:1625-31,1988.
58. De Camilli P., Benfenati F., Valtorta F., Greengard P. The synapsins. **Annu. Rev. Cell Biol.** 6:433-60, 1990.
59. DeGennaro L.J., Kanazir S.D., Wallace W.C., Lewis R.M., Greengard P. Neuron-specific phosphoproteins as models for neuronal gene expression. **Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.**48 Pt 1:337-45, 1983.
60. Deguchi T. Activation of guanylate cyclase in cerebral cortex of rat by hydroxylamine. **J. Biol. Chem.** 252:596-601, 1977.
61. Deguchi T., Yoshioka M. L-Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. **J. Biol. Chem.** 257:10147-51, 1982.
62. DellaCorte, C., Kalinoski, D. L., Huque, T., Wysocki, L., Restrepo, D. NADPH diaphorase staining suggests localization of nitric oxide synthase within mature vertebrate olfactory neurons. **Neuroscience.** 66:215-225, 1995.
63. Derer P., Derer M. Ontogenesis of NADPH-d neurons in the mouse forebrain. **Neurosci. Letters.** 152:21-24, 1993.
64. Diket A.L., Pierce M.R., Munshi U.K., Voelker C.A., Eloby-Childress S., Greenberg S.S., Zhang X.J., Clark D.A., Miller M.J. Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rats. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 171:1243-50, 1994.
65. Dinerman J.L., Dawson T.M., Schell M.J., Snowman A., Snyder S.H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91:4214-8,1994.
66. Doucette J.R., Kiernan J.A., Flumerfelt B.A. Two different patterns of retrograde degeneration in the olfactory epithelium following transection of primary olfactory axons. **J. Anat.** 136, 673-689, 1983.
67. Douglas T.H. Patterson S.I., Smith D.S., Skene J.H. Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. **Nature.** 366: 562-565, 1993.
68. Edelman G.M., Gally J.A. Nitric oxide: linking space and time in the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 89:11651-11652, 1992.
69. Edwards D.L., Arora C.P., Bui D.T., Castro L.C. Long-term nitric oxide blockade in the pregnant rat: effects on blood pressure and plasma levels of endothelin-1. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 175:484-8, 1996.
70. Egberongbe Y.I., Gentleman S.M., Falkai P., Bogerts B., Polak J.M., Roberts G.W. The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. **Neuroscience.** 59:561-78, 1994.
71. Eisthen L.H., Sengelaub D.R., Schroeder D.M., Alberts J.R. Anatomy and forebrain projections of the olfactory and vomeronasal organs in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). **Brain Behav. Evol.** 44, 108-124, 1994.
72. Elofsson R., Carberg M., Moroz M., Nezhlin L., Sakharov. Is nitric oxide (NO) produced by invertebrate neurones?. **Neuroreport.** 4: 279-282, 1993.
73. Elphick MR, Green IC, O'Shea M. Nitric oxide synthesis and action in an invertebrate brain. **Brain Res.** 619:344-6, 1993.
74. Endoh M., Maiese K., Wagner J.A.. Expression of the neural form of nitric oxide synthase by CA1 hippocampal neurons and other central nervous system neurons. **Neuroscience.** 63:679-89, 1994.
75. Erxleben C., Hermann A. Nitric oxide augments voltage-activated calcium currents of crustacea (*Idotea baltica*) skeletal muscle. **Neurosci. Lett.** 300:133-6, 2001.
76. Faraci F.M. Vascular protection. **Stroke.** 34:327-9, 2003.
77. Farbman A. Cell biology of olfaction. Cambridge Univ. Press, Canada, 1992.
78. Ferreira A., Han Q., Greengard P., Kosik S. Suppression of synapsin II inhibits the formation and maintenance of synapses in hippocampal culture. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 92:9225-9, 1995.

79. Ferreira A., Chin S., Li L., Lanier M., Kosik S., Greengard P. Distinct roles of synapsin I and synapsin II during neuronal development. **Mol. Med.** 4:22-8, 1998.
80. Ferreira A., Kao T., Feng J., Rapoport M., Greengard P. Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation. **J. Neurosci.** 20:3736-44, 2000.
81. Ferreira A., Rapoport M. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. **Cell Mol. Life Sci.** 59:589-95, 2002.
82. Fiallos-Estrada C.E., Kummer W., Mayer B., Bravo R., Zimmermann M., Herdegen T. Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. **Neurosci. Lett.** 150:169-73, 1993.
83. Finger T.E., Womble M., Kinnamon J.C., Ueda T. Synapsin I-like immunoreactivity in nerve fibers associated with lingual taste buds of the rat. **J. Comp. Neurol.** 292:283-90, 1990.
84. Finney E.M., Shatz C.J. Establishment of patterned thalamocortical connections does not require nitric oxide synthase. **J. Neurosci.** 18:8826-38, 1998.
85. Flores A., León-Olea M., Vega R., Soto E. Histochemistry and the role of nitric oxide synthase in the amphibian (*Ambystoma tigrinum*) inner ear. **Neurosci. Letters.** 205: 131-134, 1996.
86. Forsterman U., Schmidt H.H.W., Pollock J.C., Sheng H., Mitchell J.A., Warner T.D., Nakane M., Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochem. Pharmacol.** 10:1849-1857, 1991.
87. Furchgott R., Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** 288: 373-376, 1980.
88. Furchgott R.. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drug. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 24:175-197, 1984.
89. Galea E., Reis D.J., Xu H., Feinstein D.L. Transient expression of calcium-independent nitric oxide synthase in blood vessels during brain development. **FASEB J.** 9:1632-7, 1995.
90. Gally A., Montague R., Reeke N. Jr., Edelman M. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 87:143-147, 1990.
91. Garthwaite J., Charles S.L., Chees-Williams R. 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role an intercellular messenger in the brain. **Nature.** 336: 385-88, 1988.
92. Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.M.J., Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol.** 172:413-416, 1989a.
93. Garthwaite J., Southam E., Anderton M. A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. **J. Neurochem.** 53: 1952-1954, 1989b.
94. Garthwaite J., Boulton C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu. Rev. Physiol.** 57:683-706, 1995.
95. Gelperin A. Nitric Oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. **Letters to Nature.** 369: 61-63, 1994.
96. Gelperin A., Kleinfeld D., Denk W., Cooke I.R. Oscillations and gaseous oxides in invertebrate olfaction. **J. Neurobiol.** 30: 110-122, 1996.
97. Gelperin A., Flores J., Raccuia-Behling F., Cooke I.R. Nitric oxide and carbon monoxide modulate oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. **J. Neurophysiol.** 83: 116-127, 2000.
98. Getchell M.L., Getchell T.V. b-Adrenergic regulation of the secretory granule content of acinar cells in olfactory glands of the salamander. **J. Comp. Physiol. A** 155: 435-443, 1984.
99. Giulli G., Luzi A., Madeline Poyard, Guellaën G. Expression of mouse brain soluble guanylyl cyclase and No synthase during ontogeny. **Dev. Brain Res.** 81: 269-283, 1994.
100. Goelz S.E., Nestler E.J., Chehrizi B., Greengard P. Distribution of protein I in mammalian brain as determined by a detergent-based radioimmunoassay. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 78 :2130-4, 1981.
101. González A., Smeets W.J. Distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the brain of *Typhlonectes compressicauda* (Amphibia, Gymnophiona): further assessment of primitive and derived traits of amphibian catecholamine systems. **J. Chem. Neuroanat.** 8:19-32, 1994.
102. González A., Muñoz A., Muñoz M., Marín O., Arévalo R., Porteros A., Alonso J.R. Nitric oxide synthase in the brain of a urodela amphibian (*Pleurodeles walt*) and its relation to catecholaminergic neural structures. **Brain Res.** 727: 49-64, 1996.
103. González A., Moreno N., Morona R., López J.M. Somatostatin-like immunoreactivity in the brain of the urodela amphibian *Pleurodeles walt*. Colocalization with catecholamines and nitric oxide. **Brain Res.** 965:246-58, 2003.

104. González A., Moreno N., López J.M. Distribution of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the caecilian *Dermophis mexicanus* (amphibia: gymnophiona): comparative aspects in amphibians. **Brain Behav. Evol.** 60:80-100, 2002.
105. González A., López J.M., Sánchez-Camacho C., Marín O. Regional expression of the homeobox gene NKX2-1 defines pallidal and interneuronal populations in the basal ganglia of amphibians. **Neuroscience.** 114:567-75, 2002.
106. Graziadei G.A., Graziadei P.P. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. **J. Neurocytol.** 8: 197-213, 1979.
107. Graziadei P.P., DeHan R.S. Neuronal regeneration in frog olfactory system. **J. Cell Biol.** 59: 525-553, 1973.
108. Graziadei P.P., Monti Graziadei G.A. Olfactory epithelium of *Necturus maculosus* and *Ambystoma tigrinum*. **J. Neurocytol.** 5: 11-32, 1976.
109. Graziadei P.P., Okano M. Neuronal degeneration and regeneration in the olfactory epithelium of pigeon following transection of the first cranial nerve: **Acta Anat. (Basel)** 104: 220-236, 1979.
110. Graziadei P.P., Karlan M.S., Graziadei G.A., Bernstein J.J. Neurogenesis of sensory neurons in the primate olfactory system after section of the fila olfactoria. **Brain Res.** 186: 289-300, 1980.
111. Graziadei P.P.C., Monti Graziadei, G.A. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat. **J. Neurocytol.** 9:145-162, 1980.
112. Greengard P., Valtorta F., Czernik J., Benfenati, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science.** 259:780-785, 1993.
113. Gressens P. [Vasoactive intestinal peptide: a novel neurotrophic factor]. **Arch. Pediatr.** 5:654-60, 1998.
114. Guglielmotti V., Fiorino L. Nitric oxide synthase activity reveals an asymmetrical organization of the frog habenulae during development: A histochemical and cytoarchitectonic study from tadpoles to the mature *Rana esculenta*, with notes on the pineal complex. **J. Comp. Neurol.** 411:441-54, 1999.
115. Hanazawa T., Motosugi H., Konno A., Kaneko T., Tanaka K., Chiba T. Distribution of NADPH-diaphorase positive nerve fibers in the rat nasal mucosa. **Neurosci. Lett.** 159, 71-74, 1993.
116. Hanazawa T., Konno A., Kaneko T., Tanaka K., Ohshima H., Esumi H., Chiba T. Nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibers in the nasal mucosa of the rat. **Brain Res.** 657, 7-13, 1994.
117. Hanbauer I., Wink D., Osawa Y., Edelman G.M., Gally J.A. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. **Neuroreport.** 3: 409-12, 1992.
118. Haremake T., Tanaka Y., Hongo I., Yuge M., Okamoto H. Integration of multiple signal transducing pathways on Fgf response elements of the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. **Development.** 130:4907-17, 2003. **Epub 2003 Aug 20.**
119. Hawkins R.D., Son H., Arancio O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. **Prog. Brain Res.** 118:155-72, 1998.
120. Heales S.J., Barker J.E., Stewart V.C., Brand M.P., Hargreaves I.P., Foppa P., Land J.M., Clark J.B., Bolanos J.P. Nitric oxide, energy metabolism and neurological disease. **Biochem. Soc. Trans.** 25:939-43, 1997.
121. Herbison A.E., Simonian S.X., Norris P.J., Emson P.C. Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. **J. Neuroendocrinol.** 8:73-82, 1996.
122. Hermann A, Erxleben C. Nitric oxide activates voltage-dependent potassium currents of crustacean skeletal muscle. **Nitric Oxide.** 5:361-9, 2001.
123. Herrick J.C. The brain of tiger salamander. *Ambystoma tigrinum*. The University of Chicago and London, Press: 1948.
124. Hintze T.H. Prologue: Nitric oxide-hormones, metabolism, and function. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.** 281:H2253-5, 2001.
125. Hirooka Y., Takeshita A. [Blood pressure regulation by nitric oxide within the brain]. **Nippon Rinsho.** 58 **Suppl** 1:35-8, 2000.
126. Holmqvist B.I., Ostholm T., Alm P., Ekström P. Nitric oxide synthase in the brain of a teleost. **Neurosci. Lett.** 171, 205-208, 1994.
127. Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. **Trends. Neurosci.** 20:298-303, 1997.

128. Holtzman D.M., Lee S., Li Y., Chua-Couzens J., Xia H., Bredt D.S., Mobley W.C. Expression of neuronal-NOS in developing basal forebrain cholinergic neurons: regulation by NGF. **Neurochem. Res.** **21:861-8**, 1996.
129. Hope B. T., Michael G.J., Knigge K.M., Vicent S.R. Neural NADPH diaphorase are selectively is a nitric oxide synthase. **Proc. Nacn. Acad. Sci. U.S.A.** **88: 2811-2814**, 1991.
130. Hopkins D. A., Steinbusch H. W., Markerink van Ittersum M., De Vente J. Nitric oxide synthase, cGMP, and NO-mediated cGMP production in the olfactory bulb of the rat. **J. Comp. Neurol.** **375, 641-658**, 1996.
131. Hosaka M., Sudhof C. Synapsin III, a novel synapsin with an unusual regulation by Ca²⁺. **J. Biol. Chem.** **273:13371-4**, 1998.
132. Hu Z., Lelievre V., Rodríguez W.I., Cheng J.W., Waschek J.A. Comparative distributions of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and its selective type I receptor mRNA in the frog (*Xenopus laevis*) brain. **Regul. Pept.** **109:15-26**, 2002.
133. Huang E.P. Synaptic plasticity: a role for nitric oxide in LTP. **Curr. Biol.** **7:R141-3**, 1997.
134. Huang P.L., Dawson T.M., Bredt D.S., Snyder S.H., Fishman M.C. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. **Cell.** **75:1273-86**, 1993.
135. Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link?. **Trends. Neurosci.** **16: 206-214**, 1993.
136. Ignarro L.J., Napoli C., Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. **Circ. Res.** **90:21-8**, 2002.
137. Inamura K., Kashiwayanagi M., Kurihara K. Effects of cGMP and sodium nitroprusside on odor responses in turtle olfactory sensory neurons. **Am. J. Physiol.** **275: C1201-C1206**, 1998.
138. Inglis M., Furia F., Zuckerman E., Strittmatter M., Kalb G. The role of nitric oxide and NMDA receptors in the development of motor neuron dendrites. **J. Neurosci.** **18: 10493-501**, 1998.
139. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? **J. Clin. Invest.** **111:163-9**, 2003.
140. Iwase K., Iyama K., Akagi K., Yano S., Fukunaga K., Miyamoto E., Mori M., Takiguchi M. Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic *in situ* hybridization. **Brain Res. Mol. Brain Res.** **53:1-12**, 1998.
141. Jacintho J.D., Kovacic P. Neurotransmission and neurotoxicity by nitric oxide, catecholamines, and glutamate: unifying themes of reactive oxygen species and electron transfer. **Curr. Med. Chem.** **10: 2693-703**, 2003.
142. Jacklet J.W., Gruhn M. Co-localization of NADPH-diaphorase and myomodulin in synaptic glomeruli of Aplysia. **Neuroreport.** **5:1841-4**, 1994.
143. Jaffrey R., Benfenati F., Snowman M., Czernik J., Snyder H. Neuronal nitric oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **99:3199-204**, 2002.
144. Jeon S.Y., Kim J., Hwang, E.G. Origin and distribution of NADPH diaphorase-positive nerves in rat nasal mucosa. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.** **106, 688-692**, 1997.
145. Kalb G., Hockfield S. Induction of a neuronal proteoglycan by the NMDA receptor in the developing spinal cord. **Science.** **250:294-6**, 1990.
146. Kalb G., Agostini J. Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development. **Neurosc.** **57: 1-8**, 1993.
147. Kalb G. Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA receptor activation. **Development.** **120:3063-71**, 1994.
148. Kao T., Porton B., Czernik J., Feng J., Yiu G., Haring M., Benfenati F., Greengard P. A third member of the synapsin gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **95:4667-72**, 1998.
149. Keilhoff G., Seidel B., Noack H., Tischmeyer W., Stanek D., Wolf G. Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. **Neuroscience.** **75:1193-201**, 1996.
150. Kendrick K.M., Guevara-Guzman R., Zorrilla J., Hinton M.R., Broad K.D., Mimmack M., Ohkura S. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. **Nature** **388: 670-674**, 1997.
151. Kidd E.J., Michel A.D., Humphrey P.P.A. Autoradiographic distribution of [³H]-N^G-nitro-L-arginine binding in rat brain. **Neuropharm.** **34: 63-73**, 1995.

152. Kishimoto J., Keverne E.B., Hardwick J., Emson P.C. Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: A histochemical, immunological and *in situ* hybridization study. **Eur. J. Neurosci.** 5:1684-1694, 1993.
153. Klatt P., Schmidt K., Brunner F., Mayer B. Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. **J. Biol. Chem.** 269: 1674-1680, 1994.
154. Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M., Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 86:5159-62, 1989.
155. Kornau H.C., Schenker L.T., Kennedy M.B., Seeburg P.H., Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. **Science.** 269: 1737-40, 1995.
156. Kozicz T., Arimura A., Maderdrut J.L., Lazar G. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the frog *Rana esculenta*. **J. Comp. Neurol.** 453:185-98, 2002.
157. Krejcy K., Schwarzacher S., Raberger G. Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine and N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in canine blood *in vitro*. Naunyn-Schmied. **Arch. Pharmacol.** 347: 342-345, 1993.
158. Kulkarni A.P., Getchell T.V., Getchel M.L. Neuronal nitric oxide synthase is localized in extrinsic nerves regulating perireceptor processes in the chemosensory nasal mucosae of rats and humans. **J. Comp. Neurol.** 345:125-138, 1994.
159. Kwong W.H., Chan W.Y., Lee K.K., Fan M., Yew D.T. Neurotransmitters, neuropeptides and calcium binding proteins in developing human cerebellum: a review. **Histochem. J.** 32:521-34, 2000.
160. Layes E., Schollmayer A., Spessert R., Vollrath L. Expression of brain nitric oxide synthase in the developing rat pineal gland coincides with the appearance of the adrenergic cyclic guanosine 3',5'-monophosphate response. **Neurosci. Lett.** 212:71-3, 1996.
161. Lazarov N.E. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. **Prog. Neurobiol.** 66:19-59, 2002.
162. Leake LD, Moroz LL. Putative nitric oxide synthase (NOS)-containing cells in the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*: NADPH-diaphorase histochemistry. **Brain Res.** 723:115-24, 1996.
163. Leimert M., Blottner D., Neuronal nitric oxide synthase (bNOS) messenger RNA and protein expression in developing rat brainstem nuclei, **Neurosci. Lett.** 342: 57-60, 2003.
164. León-Olea M., Sánchez-Alvarez M., Pellicer F., Talavera E., Sánchez-Islas E., Martínez-Lorenzana G. Distribution of nitric oxide producing neurons in the CNS of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. **Abs. Neurosci.** 479.13, 20: 1170, 1994.
165. León-Olea M., Sánchez-Alvarez M., Piña A., Bayón A: Evidence for enkephalin- and endorphin-immunoreactivity cells in the anterior pituitary of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. **J. Comp. Neurol.** 305:412-420, 1991.
166. León-Olea M., Sánchez-Alvarez M., Pellicer F., Talavera E., Sánchez-Islas E., Martínez-Lorenzana G. Distribution of nitric oxide producing neurons in the CNS of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. **Abs. Neurosci.** 20: 1173. 1994
167. Li Z.S., Furnes J.B. Young H.M., Cambell. Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase enzyme activity in neurons of the gastrointestinal tract of the toad, *Bufo marinus*. **Arch. Histol. Cytol.** 55: 333-350, 1992.
168. Lischka F. W., Schild D. Effects of nitric oxide upon olfactory receptor neurons in *Xenopus laevis*. **Neuro. Report.** 4:582-584, 1993.
169. Lohmann S.M., Ueda T., Greengard P. Ontogeny of synaptic phosphoproteins in brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 75: 4037-41, 1978.
170. López J.M., González A. Ontogeny of NADPH diaphorase/nitric oxide synthase reactivity in the brain of *Xenopus laevis*. **J. Comp. Neurol.** 445:59-77, 2002.
171. Lowestier C.J. , Snyder S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. **Cell.** 70: 705-707, 1992.
172. Lu B., Greengard P., Poo M. Exogenous synapsin I promotes functional maturation of developing neuromuscular synapses. **Neuron.** 8:521-9, 1992.
173. Maccioni R.B., Muñoz J.P., Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. **Arch. Med. Res.** 32:367-81, 2001.
174. MacDemontt A.B., Meyer M.L., Wstbrook G.L, Smith S.J., Baker J.L. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. **Nature.** 321:519-522, 1986.
175. Margolis F.L., Roberts N., Ferriero D., Feldman, J. Denervation in the primary olfactory pathway of mice: Biochemical and morphological effects. **Brain Res.** 81: 469-483, 1974.

176. Markowitsch J. The anatomical bases of memory. In *The new cognitive neuroscience*. Gazzaniga, M.S. (ed). Massachusetts: The MIT Press, pp. 785-795, 1999.
177. Marletta M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.** **268**: 12231-12234, 1993.
178. Marletta M.A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. **Trens. Biochem. Sci.** **14**: 488-492, 1989.
179. Mason C.A. Axon development in mouse cerebellum: embryonic axon forms and expression of synapsin I. **Neuroscience.** **19**: 1319-33, 1986.
180. Matsumoto T., Pollock J.S., Nakane M., Forstermann U. Developmental changes of cytosolic and particulate nitric oxide synthase in rat brain. **Brain Res. Dev. Brain Res.** **73**:199-203, 1993.
181. Mayer B. Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases. In *Nitric Oxide in the Nervous System*. Ed. Vicent, S. R. pp.21 -42. New York: Academic Press, 1995.
182. Mayer B., Schmeid K., Klatt P., Schimidt K. Reversible inactivation of endothelial nitric oxide synthase by N^G-nitro-L-arginine. **FEBS Lett.** **333**: 203-206, 1993.
183. McCabe B.J., Nicol A.U. The recognition memory of imprinting: biochemistry and electrophysiology. **Behav. Brain Res.** **98**:253-60, 1999.
184. McLean D.L., McDearmid J.R., Sillar K.T. Induction of a non-rhythmic motor pattern by nitric oxide in hatchling *Rana temporaria* embryos. **J. Exp. Biol.** **204**(Pt 7):1307-17, 2001.
185. McLean D.L., Merrywest S.D., Sillar K.T. The development of neuromodulatory systems and the maturation of motor patterns in amphibian tadpoles. **Brain Res. Bull.** **53**:595-603, 2000.
186. McLean D.L., Sillar K.T. Spatiotemporal pattern of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase reactivity in the developing central nervous system of premetamorphic *Xenopus laevis* tadpoles. **J. Comp. Neurol.** **437**:350-62, 2001.
187. Meffert K., Premack A., Schulman H. Nitric oxide stimulates Ca(2+)-independent synaptic vesicle release. **Neuron.** **12**:1235-44, 1994.
188. Meffert M.K., Premack B.A., Schulman H. Nitric oxide stimulates Ca(2+)-independent synaptic vesicle release. **Neuron.** **12**: 1235-44, 1994.
189. Meffert M.K., Calakos N.C., Scheller R.H., Schulman H. Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. **Neuron.** **16**: 1229-36, 1996.
190. Melloni Jr R.H., DeGennaro L.J. Temporal onset of synapsin I gene expression coincides with neuronal differentiation during the development of the nervous system. **J. Comp. Neurol.** **342**: 449-62, 1994.
191. Minagar A., Shapshak P., Fujimura R., Ownby R., Heyes M., Eisdorfer C. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.** **202**:13-23, 2002.
192. Moncada S., Palmer M., Higgs, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** **43**:109-142, 1991.
193. Moncada S., Higgs A., Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacol. Rev.** **49**:137-42, 1997.
194. Monck N. NO-naproxen (AstraZeneca). **IDrugs.** **6**:593-9, 2003.
195. Montague R., Gancayco D., Winn J., Marchase B., Friedlander J. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. **Science.** **263**:973-7, 1994.
196. Moon C., Terashima S., Ahn M., Kang J., Shin T. Immunohistochemical analysis of neuronal nitric oxide synthase in the trigeminal ganglia of the crotaline snake *Trimeresurus flavoviridis*. **Neurosci. Lett.** **319**:21-4, 2002.
197. Moore P.K., Oluyomi O.A., Barbbedge R.C., Wallace P., Hart S.L. L N^G-nitro-arginine methyl ester inhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.** **102**: 198-202, 1991.
198. Moore R.Y., Bernstein M.E. Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity. **J. Neurosci.** **9**: 2151-62, 1989.
199. Moreno N., López J.M., Sánchez-Camacho C., Crespo M., Muñoz M., González A. Early development of NADPH diaphorase-expressing neurons in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. **Brain Res. Bull.** **57**:409-12, 2002b.
200. Moreno N., López J.M., Sánchez-Camacho C., González A. Development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. **J. Chem. Neuroanat.** **23**:105-21, 2002a.
201. Moroz L.L., Park J.H., Winlow W. Nitric oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. **Neuroreport.** **4**:643-6, 1993.

202. Mucio-Ramírez S., Miller-Pérez C., Sánchez-Islas E., Antón B., León-Olea M. Anatomical distribution of nociceptin-orphanin FQ in the central nervous system of the *Ambystoma mexicanum*. **Abs. Neurosc.** 2174, 2001.
203. Müller J.M., Lelievre V., Becq-Giraudon L., Meunier A.C. VIP as a cell-growth and differentiation neuromodulator role in neurodevelopment. **Mol. Neurobiol.** 10:115-34, 1995.
204. Müller U., Buchner E. Histochemical localization of NADPH-diaphorase in the adult *Drosophila* brain. Is nitric oxide a neuronal messenger also in insects? **Naturwissenschaften.** 80:524-6, 1993.
205. Müller U., Hildebrandt H. The nitric oxide/cGMP system in the antennal lobe of *Apis mellifera* is implicated in integrative processing of chemosensory stimuli. **Eur. J. Neurosci.** 7:2240-2248, 1995.
206. Müller U. The nitric oxide system in insects. **Prog. Neurobiol.** 51:363-381, 1996.
207. Mülsch A., Busse R. NG-nitro-L-arginine (N^G-[imino(nitroamino)metyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilatations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.** 341:143-147, 1990.
208. Muñoz M., Muñoz A., Marín O., Alonso J.R., Arévalo R., Porteros A., González A. Topological Distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the frog, *Rana perezi*. **J. Comp. Neurol.** 367: 54-69, 1996.
209. Murad F., Mittal C.K., Arnold W.P., Katsuki S., Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. **Adv. Cyclic. Nucleotide Res.** 9:145-58, 1978.
210. Murphy S., Simmons M. L., Agullo L., García A., Feinstein D.L. Galea E., Reis D.J., Minc-Golomb D., Schwartz J.P. Synthesis of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Trends. Neurosci.** 16:323-328, 1993.
211. Myslivecek J., Hassmannova J., Barcal J., Safanda J., Zalud, V. Inhibitory learning and memory in newborn rats influenced by nitric oxide. **Neuroscience.** 71: 299-31, 1996.
212. Myslivecek J. Inhibitory learning and memory in newborn rats. **Prog. Neurobiol.** 53:399-430, 1997.
213. Najjar V.A., Allen M.B. Formation of nitrogen, nitrous oxide, and nitric oxide by extracts of denitrifying bacteria. **J. Biol. Chem.** 206:209-14, 1954.
214. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.** 6:3051-64, 1992.
215. Nelson J., Demas E., Huang L., Fishman C., Dawson L., Dawson M., et al. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Nature.** 378:383-386, 1995.
216. Nemeth J., Jakab B., Reglodi D., Lubics A., Jozsa R., Hollosy T., Tamas A., Lengvari I., Gorcs T., Szolcsanyi J. Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. **Regul. Pept.** 109:3-7, 2002.
217. Northcutt R.G. Ontogeny and phylogeny: a re-evaluation of conceptual relationships and some applications. **Brain Behav. Evol.** 36:116-40, 1990.
218. Olsson C. Distribution and effects of PACAP, VIP, nitric oxide and GABA in the gut of the African clawed frog *Xenopus laevis*. **J. Exp. Biol.** 205(Pt 8):1123-34, 2002.
219. Östholm T., Holmgvist B.I., Alm P., Ekström P.E. Nitric oxide synthase in the CNS of the atlantic salmon. **Neurosc. Letters.** 168: 233-237, 1994.
220. Ott S.R., Burrows M. NADPH diaphorase histochemistry in the thoracic ganglia of locusts, crickets, and cockroaches: Species differences and the impact of fixation. **J. Comp. Neurol.** 410:387-397, 1999.
221. Paakkari I., Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. **Ann. Med.** 27:369-77, 1995.
222. Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize in mice. **Neurosc. Lett.** 74-76, 1988.
223. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** 327:524-6, 1987.
224. Parkinson J.F., Mitrovic B., Merrill J.E. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. **J. Mol. Med.** 75:174-86, 1997.
225. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney. 1998.
226. Peunova N., Scheinker V., Cline H., Enikolopov G. Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain. **J. Neurosci.** 21: 8809-8818, 2001.
227. Pfeiffer S., Leopold E., Schmidt K., Brunner F., Mayer B., Inhibition of nitric oxide synthesis by N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N^G-nitro-L-arginine. **Br. J. Pharmacol.** 118:1433-1440, 1996.
228. Pisu M.B., Conforti E., Botta L., Valli P., Bernocchi G. Nitric oxide synthase in the frog cerebellum: response of Purkinje neurons to unilateral eighth nerve transection. **Anat. Rec.** 268:73-83, 2002.

229. Porteros A., Arévalo R., Crespo C., Briñón G.J., Weruaga E., Aijón J., Alonso J.R. Nitric oxide synthase activity in the olfactory bulb of anuran and urodele amphibians. **Brain Res.** **724:67–72, 1996.**
230. Potenza M.A., Nacci C., Mitolo-Chieppa D. Immunoregulatory effects of L-arginine and therapeutical implications. **Curr. Drug Targets Immune. Endocr. Metabol. Disord.** **1:67-77, 2001.**
231. Prickaerts J., De Vente J., Markerink-Van, M. Ittersum, Steinbusch W. Behavioural, neurochemical and neuroanatomical effects of chronic postnatal N-nitro-L-arginine methyl ester treatment in neonatal and adult rats. **Neuroscience.** **87:181-95, 1998.**
232. Prasada Rao P.D., Sato T., Ueck M. Distribution of NADPH-diaphorase activity in the hypothalamo-hypophysial system of the frog, *Rana esculenta*. **Neurosci. Lett.** **235:61-4, 1997.**
233. Rao S.G. The neuropharmacology of centrally-acting analgesic medications in fibromyalgia. **Rheum. Dis. Clin. North Am.** **28:235-59, 2002.**
234. Rees D.D., Palmer R.M.J., Schulz R., Hodson H.F. Moncada S. Characterization of tree inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.** **101:746-752, 1990.**
235. Regidor J., Poch L. Histochemical analysis of the lizard cortex: An acetylcholinesterase, cytochrome oxidase and NADPH-diaphorase study. In W.K. Schwertfeger and W.J.A.J. Smeets (eds): *The Forebrain of reptiles*. Basel: Karger, pp 74-84, 1988.
236. Rickard N.S., Gibbs M.E. Effects of nitric oxide inhibition on avoidance learning in the chick are lateralized and localized. **Neurobiol. Learn. Mem.** **79:252-6, 2003.**
237. Riederer A., Held B., Mayer B., and Worl J. Histochemical and immunocytochemical study of nitrenergic innervation in human nasal mucosa. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.** **108:869–875, 1999.**
238. Rodrigo J., Springall D.R., Uttenthal O., Bentura M.L., Abadia-Molina F., Riveros-Molina V., Martínez-Murillo R., Polak J.L., Moncada S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** **345: 175-221, 1994.**
239. Rose S.P. God's organism? The chick as a model system for memory studies. **Learn. Mem.** **7:1-17, 2000.**
240. Roskams A.J., Bredt D.S., Dawson T.M. Ronnett V.G. Nitric oxide mediated the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. **Neuron.** **13:289-299,1994.**
241. Rubbo H., Darley-Usmar V., Freeman B.A. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. **Chem Res Toxicol.** **9:809-20, 1996.**
242. Sakai M., Sawada T., Nishimura T., Nagatsu I. Expression of nitric oxide synthase in the mouse and human nasal mucosa. **Acta Histochem. Cytochem.** **29:177–179, 1996.**
243. Salas S.P., Altermatt F., Campos M., Giacaman A., Rosso P. Effects of long-term nitric oxide synthesis inhibition on plasma volume expansion and fetal growth in the pregnant rat. **Hypertension.** **26:1019-23, 1995.**
244. Samara B., Chateau D., Boehm N. Expression of NADPH-diaphorase in the rat forebrain during development. **Neurosci. Lett.** **184: 204-207, 1995.**
245. Sánchez-Álvarez M., León-Olea M., Talavera E., Pellicer F., Sánchez-Islas E., Martínez-Lorenzana G. Distribution of NADPH-diaphorase in the periesophageal ganglia of the snail, *Helix aspersa*. **Neurosci. Lett.** **169: 51-55, 1994.**
246. Sánchez-Islas E., Sánchez-Alvarez M, Pellicer F., León-Olea M. Immunohistochemical localization of enkephalin in the central nervous system of axolotl, *Ambystoma mexicanum*. **Soc. Neurosci. Abs.** **23(1): 202.8, 1993.**
247. Sánchez-Islas E., Anton B., León-Olea M. Anatomical distribution of the nitric oxide synthase and NADPH-d in the development of the CNS of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. **Soc. Neurosci. Abs.** **25(1), 1999.**
248. Sánchez-Islas E., León-Olea M. Histochemical and immunohistochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the olfactory epithelium of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. **Nitric Oxide.** **5:302-16, 2001.**
249. Sato T. NADPH-diaphorase positive amacrine cells in the retina of the frog (*Rana esculenta*) and pigeon (*Columbia livia*). **Archs. Hist. Cyt.** **53: 63-69, 1990.**
250. Sattler R., Xiong Z., Lu W.Y., Hafner M., MacDonald J.F., Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. **Science** **284: 1845-8, 1999.**
251. Schaeffer E., Alder J., Greengard P., Poo M. Synapsin IIa accelerates functional development of neuromuscular synapses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **91:3882-6, 1994.**
252. Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H., McGeer E.G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J. Neurosci. Methods.** **9:229-34, 1983.**

253. Schober A., Maltz C.R., Meyer D.L. Enzyme histochemical demonstration of nitric oxide synthase in the diencephalon of the rainbow trout (*Oncorhynchus mickiss*). **Neurosci. Lett.** **151: 67-70, 1993.**
254. Schober A., Malz C.R., Schober W., Meyer D.L. NADPH-diaphorase in the central nervous system of the larval lamprey (*Lampetra planeri*). **J. Comp. Neurol.** **345:94-104, 1994.**
255. Scholz N.L., Labenia J.S., de Vente J., Graubard K., Goy M.F. Expression of nitric oxide synthase and nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the crustacean cardiac ganglion. **J. Comp. Neurol.** **454:158-67, 2002.**
256. Schreckenberg G.M., Jacobson A. G. Normal Stages of development of axolotl, *Ambystoma mexicanum*. **Dev. Biol.** **42:391-400, 1975.**
257. Schwob J.E., Szumowski K.E., Stasky A.A. Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival. **J. Neurosci.** **12: 3896-3919, 1992.**
258. Serfozo Z., Elekes K. Nitric oxide level regulates the embryonic development of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: pharmacological, behavioral, and ultrastructural studies. **Cell Tissue Res.** **310:119-30, 2002. Epub 2002 Aug 21.**
259. Shinde U.A., Mehta A.A., Goyal, R.K. Nitric oxide: A molecule of the millennium. **Indian J. Exp. Biol.** **38: 201-210, 2000.**
260. Singru P.S., Sakharkar A.J., Subhedar N. Neuronal nitric oxide synthase in the olfactory system of an adult teleost fish *Oreochromis mossambicus*. **Brain Res.** **977:157-68, 2003.**
261. Smeets W.J., Alonso J.R., Gonzalez A. Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in relation to catecholaminergic neuronal structures in the brain of the lizard *Gekko gekko*. **J. Comp. Neurol.** **377:121-41, 1997.**
262. Snyder S. H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters?. **Science.** **257: 494-496, 1992.**
263. Snyder S.H., Bredt D.S. Biological roles of nitric oxide. **Sci. Am.** **266:74-77, 1992.**
264. Somoza G.M., Miranda L.A., Strobl-Mazzulla P., Guilgur L.G. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. **Cell Mol. Neurobiol.** **22:589-609, 2002.**
265. Stuehr D.J., Griffith O.W. Mammalian nitric oxide synthases. **Adv. Enzymol. Mol. Biol.** **346: 287-347, 1992.**
266. Suemaru S., Sato K., Morimoto K., Yamada N., Sato T., Kuroda S. Increment of synapsin I immunoreactivity in the hippocampus of the rat kindling model of epilepsy. **NeuroReport.** **11: 1319-1322, 2000.**
267. Südhof C., Czernik J., Kao T., Takei K., Johnston A., Horiuchi A., Kanazir D., Wagner A., Perin S., De Camilli P., et al. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. **Science.** **245:1474-80, 1989.**
268. Takemura M., Wakisaka S., Iwase K., Yabuta N.H., Nakagawa S., Chen K., Bae Y.C., Yoshida A., Shigenaga Y. NADPH-diaphorase in the developing rat: lower brainstem and cervical spinal cord, with special reference to the trigemino-solitary complex. **J. Comp. Neurol.** **365:511-25, 1996.**
269. Talavera E., Martínez-Lorenzana G., León-Olea M., Sánchez-Islas E., Sánchez-Álvarez M., Pellicer F. Histochemical distribution of NADPH-diphorase in the cerebral ganglia of the crayfish *Cambarellus montezumae*. **Neurosc. Letters.** **187: 177-180, 1995.**
270. Taylor B.E., Harris M.B., Burk M., Smyth K., Lukowiak K., Remmers J.E. Nitric oxide mediates metabolism as well as respiratory and cardiac responses to hypoxia in the snail *Lymnaea stagnalis*. **J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.** **295:37-46, 2003.**
271. Tenorio F., Giraldi-Guimaraes A., Méndez-Otero R. Developmental changes of nitric oxide synthase in the rat superior colliculus. **J. Neurosci. Res.** **42:633-7, 1995.**
272. Terada H., Toshisaburo N., Kimura H., Kitahama K., Okada S. Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in fetal rat brains at embryonic day 15 and day 19. **J. Chem. Neuroanat.** **10: 273-278, 1996.**
273. Thomas E., Pearse A. The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. **Histochemie.** **2:266-282, 1961.**
274. Thomas E, Pearse AG. The solitary active cells. Histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a tprn-diaphorase reaction. **Acta Neuropathol. (Berl).** **27:238-49, 1964.**
275. Tracey W.R., Nakane M., Pollock J.S., Forstermann U. Nitric oxide synthase in neuronal cell, macrophages and endothelium are NADPH-diphorase, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **195: 1035-40, 1993.**
276. Tuinhof R., González A., Smeets W.J., Roubos E.W. Neuropeptide Y in the developing and adult brain of the South African clawed toad *Xenopus laevis*. **J. Chem. Neuroanat.** **7:271-83,1994.**

277. Ueda T., Stratford C.A., Larson J. Distribution of protein I, a synapse-specific phosphoprotein, and adenylyl cyclase in the rat spinal cord. **J. Neurochem.** **36: 293-6, 1981.**
278. Vallance P., Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart.** **85:342-50, 2001.**
279. Valtorta F., Iezzi N., Benfenati F., Lu B., Poo M., Greengard P. Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis*. **Eur. J. Neurosci.** **7:261-70, 1995.**
280. Verhoeven N.W. Studies on true dissimilatory nitrate reduction. V. Nitric oxide production and consumption by micro-organisms. **Antonie Van Leeuwenhoek.** **22:385-406, 1956.**
281. Villani L. Development of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the cichlid fish, *Tilapia mariae*. **Brain Behav. Evol.** **54:147-58, 1999.**
282. Vincent S.R. NADPH-diaphorase histochemistry and neurotransmitter coexistence. In *Neurohistochemistry: Modern Methods and Applications* (Panula, P., Paivrinta, H., and Soinila, S., Eds.), pp. 375-396, A. R. Liss, New York. 1986.
283. Vincent R., Kimura, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience.** **46:755-748, 1992.**
284. Vincent S.R., Hope B.T. Neurons that say NO. **Trends Neurosci.** **15:108-13, 1992.**
285. Vincent S.R. Histochemistry of nitric oxide synthases in the central nervous system. En *Functional Neuroanatomy of the Nitric Oxide System*. Ed. Steinbusch H.W.M., De Vente J., Vincent, S.R. Cap II, pp.19 -49. Amsterdam: Elsevier, 2000.
286. Virgili M., Monti B., LoRusso A., Bentivogli M., Contestabile A. Developmental effects of in vivo and in vitro inhibition of nitric oxide synthase in neurons. **Brain Res.** **839:164-72, 1999.**
287. Vizzard M.A., Erdman S.L., de Groat W.C. The effect of rhizotomy on NADPH diaphorase staining in the lumbar spinal cord of the rat. **Brain Res.** **607:349-53, 1993.**
288. Vizzard M.A., Erdman S.L., Forstermann U., de Groat W.C. Ontogeny of nitric oxide synthase in the lumbosacral spinal cord of the neonatal rat. **Brain Res. Dev. Brain Res.** **81:201-17, 1994.**
289. Walford G., Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. **J. Thromb. Haemost.** **1:2112-8, 2003.**
290. Wang R.T., Halpern M. Neurogenesis in the vomeronasal epithelium of adult garter snakes. 2. Reconstitution of the bipolar neuron layer following experimental vomeronasal axotomy. **Brain Res.** **237: 41-59, 1982.**
291. Wensch, S., Andressen, C., Derouiche, A., Arnhold, S., Addicks, K., Leiser, R. Heme oxygenase-2 and nitric oxide synthase immunoreactivity of bovine olfactory receptor neurons and a comparison with the distribution of NADPHdiaphorase staining. **Histochem. J.** **32: 381-388, 2000.**
292. Williams C.V., Nordquist D, McLoon S.C. Involvement of nitric oxide in the elimination of transient retinotectal projections in the developing visual system. **J. Neurosci.** **14:1746-1755, 1994.**
293. Wilson KC, Raisman G. Age-related changes in the neurosensory epithelium of the mouse vomeronasal organ: extended period of postnatal growth in size and evidence for rapid cell turnover in the adult. **Brain Res.** **185:103-13, 1980.**
294. Wu H.H., Williams C.V., McLoon S.C. Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. **Science.** **235:1593-1596, 1994.**
295. Xie M., Hermann A., Kerschbaum H.H. Complementary distribution of NADPH-diaphorase and l-arginine in the snail nervous system. **Cell Tissue Res.** **307:393-400, 2002. Epub 2002 Feb 19.**
296. Yallampalli C., Garfield R.E. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. **Am. J. Obstet. Gynecol.** **169:1316-20, 1993.**
297. Yamada K. [Role of nitric oxide in learning and memory processes]. **Nippon Yakurigaku Zasshi.** **111:87-96,1998.**
298. Yamamoto R., Bredt D.S., Snyder S.H., Stone R.A. The localization of the nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. **Neuroscience.** **54: 189-200, 1993.**
299. Yamamoto T., Yao Y., Harumi T., Suzuki N. Localization of the nitric oxide/cGMP signaling pathway-related genes and influences of morpholino knock-down of soluble guanylyl cyclase on medaka fish embryogenesis. **Zoolog. Sci.** **20:181-91, 2003.**
300. Yeo J.F. Does nitric oxide plays a role in orofacial pain transmission? **Ann. N.Y. Acad. Sci.** **962:151-60, 2002.**
301. Yun H.Y., Dawson V.L., Dawson T.T. Neurobiology of nitric oxide. **Crit. Rev. Neurobiol.** **10:291-316, 1996.**
302. Zhu X.Z., Luo L.G. Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. **J. Neurochem.** **59:932-5,1992.**
303. Ziche M., Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. **J. Neurooncol.** **50:139-48, 2000.**

304. Zielinski B.S., Osahan J.K., Hara T.J., Hosseini M., Wong E. Nitric oxide synthase in the olfactory mucosa of the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). **J. Comp. Neurol.** **365:18-26, 1996.**
305. Zigmond J.M., Bloom F.E., Landig S.C., Roberts J.L., Squire L.R. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press. USA. 1999.
306. Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.** **429:23-37, 2001.**

ANEXOS



Histochemical and Immunohistochemical Localization of Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Olfactory Epithelium of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*

Eduardo Sánchez-Islas and Martha León-Olea¹

Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica, División de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría, Av. México-Xochimilco No. 101, México 14370 D.F., México

Received January 22, 2001; published online June 19, 2001

The aim of this study was to describe the anatomic distribution of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity (nNOS-IR) and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) staining in the olfactory epithelium of the axolotl, juvenile, and neotenic adult, *Ambystoma mexicanum*. Nitric oxide (NO, nitrogen monoxide) is a widespread molecule that has been identified both as a neuromodulator and as an intracellular messenger. In the olfactory system, NO has been proposed to play a role in olfactory transduction. Nitric oxide synthase (NOS) can be detected by histochemical (NADPH-d) and immunohistochemical techniques. NADPH-d staining has been described in olfactory receptor neurons (ORN) of several species; however, nNOS-IR has not always been found at ORN. Present results show intense NADPH-d staining and nNOS-IR in the dendrites and cell bodies of ORN in both the nasal cavity and the vomeronasal organ of axolotls. Unilateral olfactory axotomy was conducted to confirm that labels were at ORN. Two weeks after this procedure an important decrease in NADPH-d staining and nNOS-IR was observed. The remaining labels were mostly in basal cells. By 5 weeks postaxotomy both labels were almost totally absent. Thus, both NADPH-d staining and nNOS-IR were mainly localized in ORN. NADPH-d staining and nNOS-IR were also found in nerve fibers surrounding arterioles, as well as in secretory

and duct cells of the Bowman's glands. This last anatomical localization suggests that in the *A. mexicanum* NO might be involved in functions other than only olfactory transduction, such as regulation of local blood flow, glandular secretion, and ORN development. © 2001 Academic Press

Key Words: nitric oxide; olfaction; amphibian; NADPH-d.

Nitric oxide (NO,² nitrogen monoxide) is a gas that acts as a neurotransmitter and as a second messenger in the central nervous system (CNS) (1–5). This molecule has been proposed to play a role in olfactory signal processing based mainly on the following: (a) the anatomical localization of the nitric oxide synthase (NOS), the enzyme responsible for NO formation, in the olfactory system of both invertebrates (6–15) and vertebrates (16–25); and (b) the functional data suggesting the participation of the NO/cGMP system in olfactory transduction (17, 26–29). In this respect, different groups have demonstrated that stimulation of olfactory receptor neurons (ORN) with high doses of odorants or pheromones increase intraneuronal cGMP levels and that this increase can be prevented by L-N^G-nitroarginine, a selective

¹ To whom correspondence should be addressed. Fax: (525) 655 99 80. E-mail: marthalo@imp.edu.mx.

² Abbreviations used: NO, nitric oxide/nitrogen monoxide; CNS, central nervous system; NOS, nitric oxide synthase; ORN, olfactory receptor neurons; OE, olfactory epithelium; PB, phosphate buffer; EOG, electroolfactographic.

TABLE I
Localization of nNOS and NADPH-d Staining in the Nasal Epithelium of Different Vertebrates

Animal	Structures												Refs.
	ORN-OE		ORN-VO		NF		BG-SC		BG-NF		BV-NF		
	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	NOS/ND	
Human	-	+	-	+	-	+	-	+	-	○	+	+	45
	-	○	-	○	-	○	-	○	-	○	-	○	47
Rat	○	○	-	-	+	+	○	○	-	+	+	+	48
	○	+	○	+	○	-	○	-	○	-	○	-	20
	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	45
	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	49, 50
Mouse	○	-	○	+	○	+	○	+	○	+	○	+	51
	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	18
Frog (<i>Rana perezi</i>)	-	○	-	○	+	○	-	○	+	○	-	○	47
Newt (<i>Triturus marmoratus</i>)	○	○	○	○	-	-	○	○	○	○	○	○	23
Catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)	○	+	NA	○	○	-	NA	○	NA	○	○	-	20
Lamprey (<i>Petromyzon marinus</i>)	+	+	NA	○	○	-	NA	○	NA	○	○	-	24

Note. Abbreviations used: BG-NF, nerve fibers around the Bowman's glands; BV-NF, nerve fibers around the blood vessels; BG-SC, secretory cells the Bowman's glands; NA, not applicable; NF, nerve fibers; ORN-OE, olfactory receptor neurons in the olfactory epithelium; ORN-VO, olfactory receptor neurons in the vomeronasal organ. (+) Positive or (-) negative nNOS-immunoreactivity (NOS) and/or NADPH-d-staining (ND); (○) not reported.

inhibitor of NO formation (17, 26). There are also data indicating that, in the olfactory bulb, NO participates in the formation of the olfactory memory via cGMP (11, 12, 30, 31).

The most widely used methods for revealing the distribution of NOS in the nervous system are immunohistochemistry to detect NOS and enzymatic histochemistry to detect NADPH-diaphorase activity (NADPH-d) (32–35). Actually, NOS and NADPH-d are considered to be the same enzyme (36–39). Thus, colocalization of immunoreactivity (IR) to neuronal NOS (nNOS) and NADPH-d staining has been demonstrated in most nuclei of the vertebrate central nervous system (35, 36, 40–43). However, there are some neural regions where this colocalization could not be demonstrated, among them the olfactory system (23, 40, 41, 44–46). This lack of colocalization of nNOS-IR and NADPH-d staining has been described for the olfactory epithelium of several species (reviewed in Table I). This fact raised doubts on both the certainty that NADPH-d staining indicates the presence of NOS and the fact that NO is actually synthesized in the NADPH-d-stained cells.

A careful revision of the reported data reveals that no colocalization of NADPH-d staining and NOS-IR

has been found in the ORN of adult animals. However, at early stages of development and during olfactory epithelium reconstitution following axotomy and bullectomy, periods characterized by the presence of immature ORN and basal cells, both nNOS-IR and NADPH-d staining have been consistently found colocalized (52, 53). Similarly, in the premetamorphic larvae of the lamprey (*Petromyzon marinus*), both NADPH-d staining and NOS-IR have been found in the ORN (24). Thus, it appears that colocalization of both histological marks (nNOS-IR and NADPH-d) is only found during olfactory system developmental processes.

Axolotls (*Ambystoma mexicanum*, family *Ambystomatidae*) are neotenic amphibians, a term indicating that animals retain the juvenile characteristics of an ancestral species due to slowed somatic development. These amphibians remain aquatic and achieve sexual maturity while maintaining their larval appearance (54). If colocalization of NOS-IR and NADPH-d staining concurs with the occurrence of developmental processes, it appears interesting to search for such a colocalization in the axolotl, a species that remains at a certain developmental stage (neotenic).

The olfactory system of the axolotl is similar to that of other vertebrates. Its olfactory epithelium is formed by three characteristic cellular types: sustentacular cells, basal cells, and ORN (55). The ORN receive the olfactory signals, transduce olfactory information, and convey it to the olfactory bulb. These neurons consist of an elongated cell body, a thin axon, and a long dendrite. The axon emerges basally from the inferior region of the cell body and enters the olfactory nerve. The dendrite is directed apically toward the epithelium surface and ends with an apical knob in which cilia or microvilli are present, forming the mucociliary/microvillar complex. Sustentacular cells have been associated with the regulation of the mucus layer composition (56). Basal cells presumably give rise to new ORN (57, 58). Finally, the vomeronasal organ of the axolotl is localized in the lateral diverticulum that is connected to the lateral wall of the nasal cavity. It contains an olfactory epithelium (OE) with the three mentioned cell types; the axons of its ORN also enter the olfactory nerve and end in the accessory olfactory bulb. The vomeronasal organ lacks Bowman's glands (55).

The purpose of the present experiments was to describe the anatomical distribution of nNOS-IR and NADPH-d histochemical staining in the OE of the axolotl *A. mexicanum*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Axolotls, *A. mexicanum*, of either sex, 11 neotenic adults (25–30 cm long and 85–120 g body wt, sexually mature) and eight 10-month-old juveniles, sexually immature (13–15 cm long and 40–60 g body wt), were used. Adults were obtained from the Lake of Xochimilco in Mexico City. These axolotls were maintained under laboratory conditions at least 40 days before conducting the experiments. The juveniles were obtained from our colony. All animals

were maintained in an open-air aquarium (18–20°C) and subjected to an artificial day–night cycle (10 h light/14 h dark). Aquaria were kept clean with water-activated carbon filters (AquaClear 200), and the water quality was strictly monitored.

The experiments were carried out in accordance with the regulations of the Ethics Committee and were approved by the Projects Commission of the Instituto Nacional de Psiquiatría.

NADPH-d histochemical and NOS immunohistochemical techniques were carried out in all animals. Unilateral olfactory axotomy was done in one group to verify that NADPH-d or NOS labels were located at the ORN.

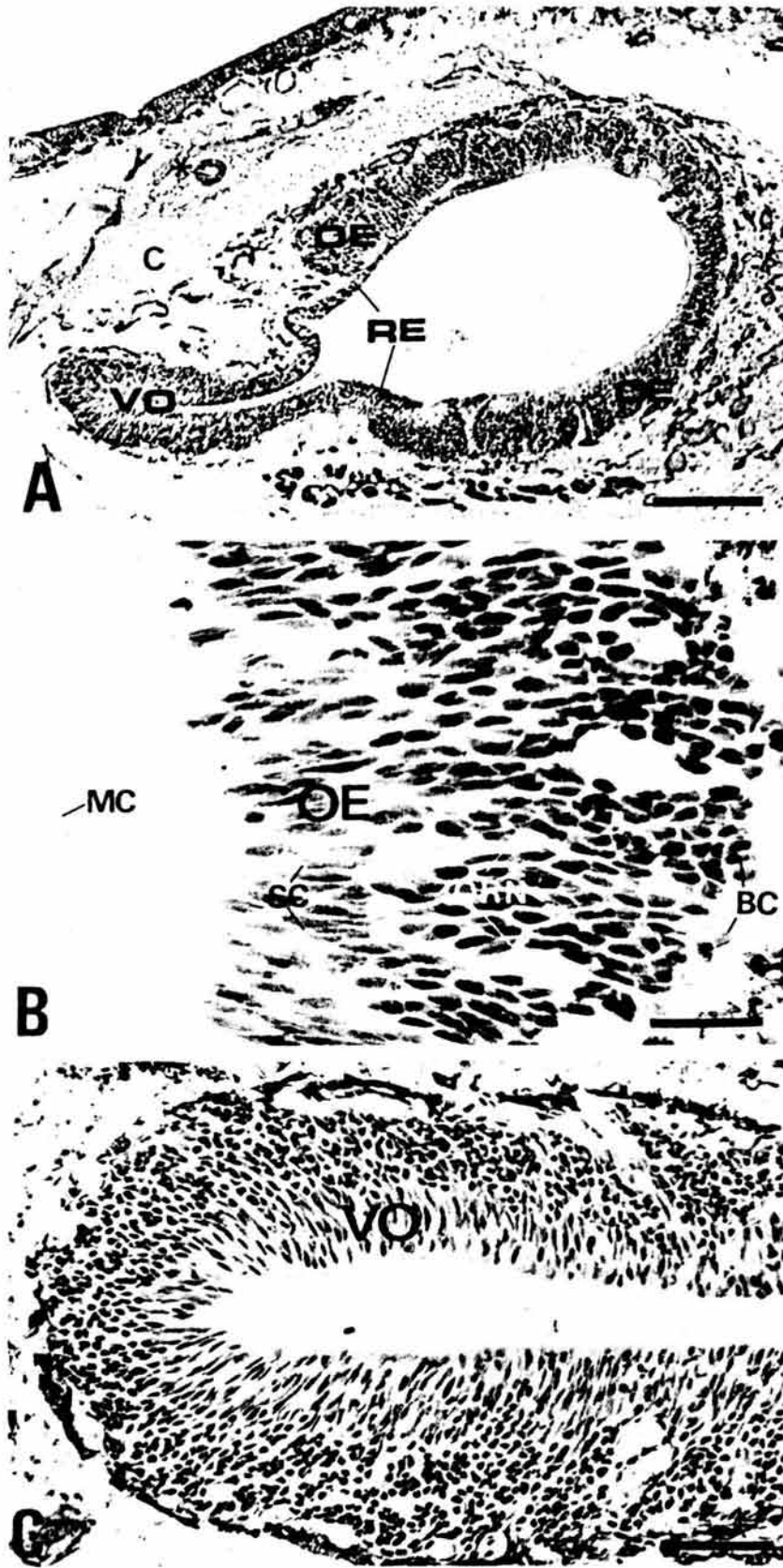
Tissue Preparation

Axolotls were anesthetized by immersion in 0.02% ethyl *p*-amino benzoate (benzocaine) (Sigma Chemical Co.) and perfused through the conus arteriosus with 100 ml of a cold 0.9% heparinized saline solution, followed by 250 ml of a fixative containing 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The nasal area was postfixed by immersion in the same fixative at 4°C for 4 h. Tissues were stored in 30% sucrose in PB at 4°C for 24 h and cut into 15- to 20- μ m-thick coronal and parasagittal sections with a cryostat at –18 to –20°C and mounted onto chrome–allume-gelatinized slides. The sections were dried and stored at 4°C until further processing. Alternate serial sections were used for NADPH-diaphorase histochemistry and NOS immunohistochemistry. The integrity of the OE was verified in some sections with a hematoxylin–eosine (H–E) technique.

NADPH-Diaphorase Histochemistry

The mounted sections were incubated in a medium to detect NADPH-d (34) containing the follow-

FIG. 1. Photomicrographs of a 20- μ m-thick coronal section through the nasal cavity of an adult axolotl, stained with hematoxylin–eosin (H–E). Medial is to the right. (A) This section illustrates the region in which the lateral diverticulum, which is lined with vomeronasal epithelium (VO), is connected with the main chamber of the nasal cavity, which is lined with patches of olfactory (OE) and respiratory epithelia (RE). The nasolacrimal duct (asterisk) can be seen above the cartilage (c) dorsolateral to the nasal cavity. (B) Olfactory epithelium from the medial portion of the nasal cavity. The epithelium contains sustentacular cells (SC), olfactory receptor neurons (ORN), and basal cells (BC). On the left side of the picture the dendrites and mucociliary/microvillar complex (MC) can be observed. (C) Olfactory epithelium of the vomeronasal organ that contains the three mentioned cell types and its mucociliary/microvillar complex. Scale bars: 500 μ m for A, 50 μ m for B, and 120 μ m for C.



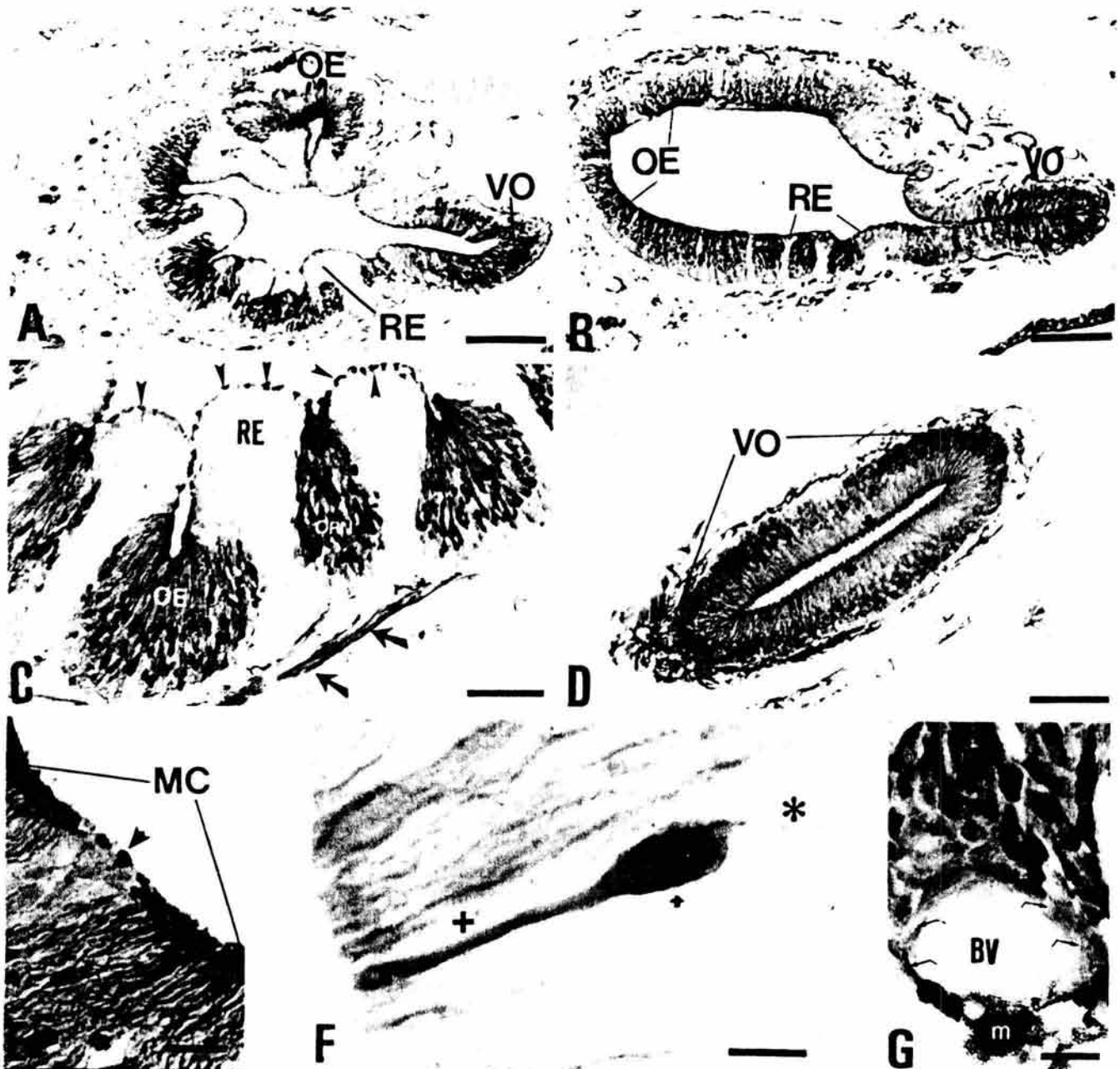


FIG. 2. Localization of NADPH-d staining in the nasal cavity of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Panoramic view of coronal sections of juvenile (A) and neotenic adult (B) axolotls. The medial part of the cavity is to the left in both sections. Notice the ridges with respiratory epithelium (RE) and the grooves with olfactory epithelium (OE) in the main chamber of the juvenile axolotl (A) compared with the smoother surface of the neotenic adult (B), which is lined with patches of RE and OE. The intense blue NADPH-d staining can be observed at olfactory receptor neurons (ORN) in the main chamber and vomeronasal organ (VO) in both sections. (C) Photomicrograph of the olfactory epithelium with NADPH-d staining in the ORN, in the nerve fiber bundles (arrows), and in the cells on the surface of the RE (arrowheads). (D) NADPH-d staining in ORN and mucociliary/microvillar complex (MC, small arrows) of the VO. (E) Intense NADPH-d staining in the dendrites and MC of the OE and stained cells on the surface of the RE (arrowhead). (F) High magnification of an ORN from the main chamber showing intense staining in the dendrite (+), the axon (asterisk), and the cell body (small arrow). (G) NADPH-d staining in the nerve fibers (curved arrow) surrounding a blood vessel (BV) localized in the lamina propria of the OE. Notice the presence of melanocytes (m) below the BV. All sections were counterstained with safranin. Scale bars: 250 μm for A; 500 μm for B; 50 μm for C; 120 μm for D; 100 μm for E and G; and 10 μm for F.

ing: PB, pH 7.4; 0.3% Triton X-100; 0.1 mg/ml nitroblue tetrazolium; 1 mg/ml β -NADPH (Sigma Chemical Co.). Incubation time was 1 h 30 min at 37°C. Rinsing in cold PB stopped the reaction. Control sections were incubated in a medium without β -NADPH or nitroblue tetrazolium. The slides were rinsed and dried overnight, counterstained with safranin (0.01%), dehydrated, and coverslipped with Entellan (Merck). The sections were analyzed in a Leitz Laborlux 12 photomicroscope and photographed with Ektar 25 ASA or T-max 100 ASA film (Kodak).

NOS Immunofluorescence

Sections were incubated for 1 h in a blocking solution consisting of 0.1 M phosphate buffer, 0.9% NaCl, pH 7.4, with 0.3% Triton X 100 (PBS-T); 1% BSA, 1% normal rabbit serum (RS) and then incubated with an antiserum against neural NOS (kindly provided by Dr. Emson, Lab Molecular Neuroscience, The Babraham Institute, Babraham, Cambridge, UK). Different dilutions of the anti-nNOS were tested (1:50 to 1:20,000), and the optimal antibody dilution for OE (1:100) was used. After rinsing with PBS-T (three times for 5 min each), fluorescein-conjugated rabbit anti-sheep secondary antiserum, diluted 1:50 in PBS-T (Jackson, Immunoresearch Lab. or ICN Pharm., Inc.), was applied for 2 h at 37°C. After rinsing with PBS (three times for 5 min each), sections were coverslipped with Antifade (Molecular Probes, Inc.). Control alternate sections were incubated with the blocking solution without primary antibody. The specificity of the nNOS antiserum has been previously described (18, 59) and used to examine tissue from both frog and lizard (42, 43). The antibody was raised in sheep against purified recombinant rat neuronal NOS. It recognizes neuronal NOS in Western blots, and the immunoreactivity is abolished by preadsorption of the antiserum with recombinant neuronal NOS protein (1 mM overnight, at 4°C) (59). The sections were analyzed with a Leitz photomicroscope with epifluorescent illumination and photographed with 400 ASA Ektachrome Elite Kodak or T-max film.

Olfactory Axotomy

Bulbectomy and olfactory axotomy induce degeneration of mature ORN (60–66). Thus, to confirm that NADPH-d staining and NOS-IR were located in ORN we conducted a unilateral olfactory axotomy in 14 axolotls (8 neotenic adults and 6 juveniles). Axotomies were carried out in anesthetized animals by an incision in the midline of the nasal area for removal of the cranial cartilage. The olfactory nerve was exposed and cut at the proximity of the olfactory bulb. A piece of Gelfoam (The Upjohn, Co.) was introduced to reduce bleeding and prevent reinnervation. The skin was sutured. Animals recovered from anesthesia and surgery in an aquarium and were sacrificed 2 or 5 weeks later. The nasal area was processed using the same histochemical and immunohistochemical procedures. The nonaxotomized, contralateral side was used as control.

RESULTS

Animals maintained under our laboratory conditions were healthy and showed an OE free of nasal infections as confirmed by histological analysis (Figs. 1A–1C).

Distribution of NADPH-Diaphorase Staining

The enzymatic activity of endogenous NADPH-d reduces β -NADPH in the presence of nitrotetrazolium blue (chromogen), forming an insoluble, blue formazan deposit. This blue reaction, end product of diaphorase histochemistry, is scattered through the cytoplasm of positive cells. There are morphological differences in the OE of juvenile and adult axolotls. Thus, in the juvenile animals the grooves are more profound than those of the adults, in which the epithelium is smoother (Figs. 2A and 2B). No differences in the distribution of NADPH-d between juvenile and adult neotenic animals were found; therefore, the following description applies to both. Results show the presence of NADPH-d labeling in the nasal epithelium of axolotls, with intense staining in the ORN of the OE, both in the main chamber and in the vomeronasal organ (Figs. 2A–2D). Labeling was homogeneously distributed in the cell body, the axon, and the dendrite of the olfactory neurons,

allowing a clear vision of the classical morphology of these cells (Fig. 2F). Mucociliary/microvillar complexes, which arise from the dendritic knobs, also showed an intense staining (Fig. 2E). The axons of the ORN that constitute the olfactory nerve bundles in the lamina propria exhibited intense staining (Fig. 2C). Staining was found in a few basal cells. In the lamina propria of the OE, NADPH-d-positive fibers surrounding the blood vessels were observed (Fig. 2G). At the Bowman's glands, secretory as well as duct cells presented weak NADPH-d labeling. The apical membranes of the respiratory epithelium cells presented a weak NADPH-d staining (Figs. 2A–2C and 4B).

The ORN at the vomeronasal organ, together with their mucociliary/microvillar complex, showed intense NADPH-d staining. In the lamina propria surrounding this organ, the ORN axon bundles also showed intense staining (Fig. 2D).

The control alternate sections incubated in a medium without β -NADPH or nitroblue tetrazolium; in both cases no reaction was observed.

Distribution of NOS Immunoreactivity

NOS immunoreactivity was found in the ORN of the OE of the nasal cavity and the vomeronasal organ, showing intense immunoreactivity in the dendrites and in some cell bodies and axon hillocks (Figs. 3A and 3B). Mucociliary/microvillar complexes showed an intense immunoreactivity (Figs. 3A–3C). There were a few nNOS-IR basal cells in the OE. The olfactory nerve bundles did not exhibit immunoreactivity.

In the Bowman's glands, secretory and duct cells exhibited moderate IR (Fig. 3E). Finally, fine fibers showing IR were found in the blood vessels (not shown).

At the surface of the respiratory epithelium, cells (23 μ m in length) with a moderate immunoreactivity were found, some of which exhibited basally directed processes (Fig. 4A). These cells were also NADPH-d positive (Fig. 4B).

Immunohistochemical control experiments involved parallel incubation of alternate sections either with normal serum or with the omission of primary antiserum. No residual immunostaining was detected.

Olfactory Axotomy

The performance of a unilateral olfactory axotomy allowed us a direct comparison of the normal and denervated sides of the epithelium in the same animal. In axotomized animals with at least 2 weeks of survival, an important diminishing of NADPH-d staining was observed. This diminution is due to degeneration and death of olfactory receptor neurons of the main cavity (Figs. 5A–5C) and of the vomeronasal organ (Figs. 5B and 5D). ORN in some areas exhibited morphological changes such as a nucleus with signs of chromatolysis and a dendrite becoming curly in appearance before cell death (Fig. 5A). In animals with 2 weeks postaxotomy, there were more basal cells in the OE of the axotomized side showing a strong NADPH-d staining in some grooves of the main cavity (Fig. 6A). Five weeks after axotomy, ORN staining disappeared completely from the cell body. Only a weak staining could be observed in some ORN dendrites (Figs. 5B and 5C). NADPH-d staining in the mucociliary/microvillar complex of the main cavity had a small decrease, without change in the vomeronasal organ 5 weeks after axotomy (Fig. 5D). A decrease in NADPH-d staining was also observed in nervous fiber bundles. In these structures, dotted staining was observed 2 weeks after axotomy (Fig. 5A) and after 5 weeks the staining was totally lost (Fig. 5C). The OE and the vomeronasal organ, contralateral to the lesion (control), exhibited the same NADPH-d staining distribution observed in animals that were not axotomized.

nNOS-IR in the axotomized side decreased markedly in the ORN. Notwithstanding, 5 weeks after axotomy some immunoreactive dendrites can still be observed (Figs. 7A–7C). nNOS-IR was also present in some basal cells of the OE (Fig. 7C). The immunoreactivity in the mucociliary/microvillar complex is shown in Figs. 7A and 7B. The label at the Bowman's glands and the nervous fibers to the vessels did not change 5 weeks after axotomy (not shown). The epithelium of the contralateral side (control) displayed normal staining and nNOS-IR at the end of the 2- and 5-week survival periods.

DISCUSSION

The results obtained in the experiments demonstrate the presence of both NADPH-d staining and

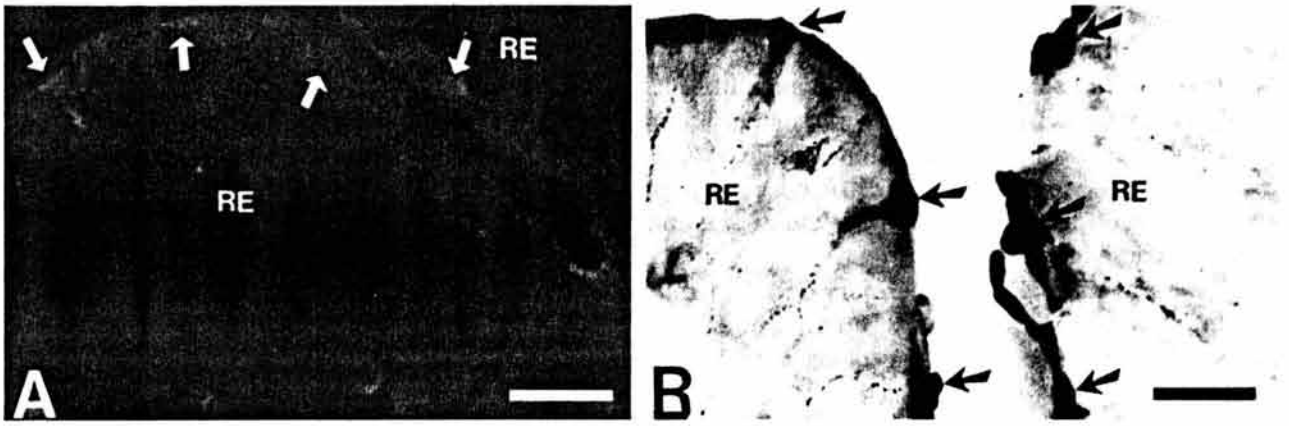
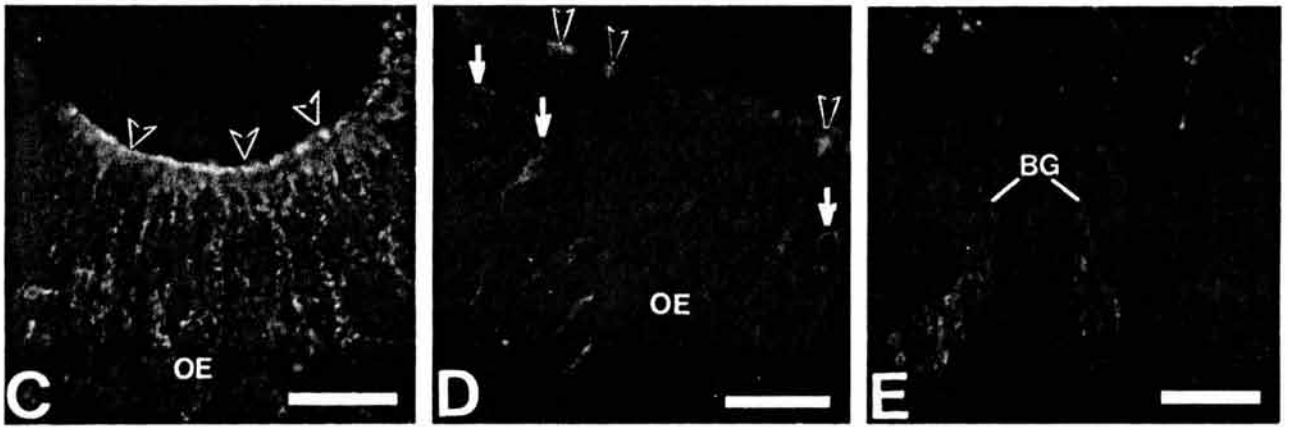
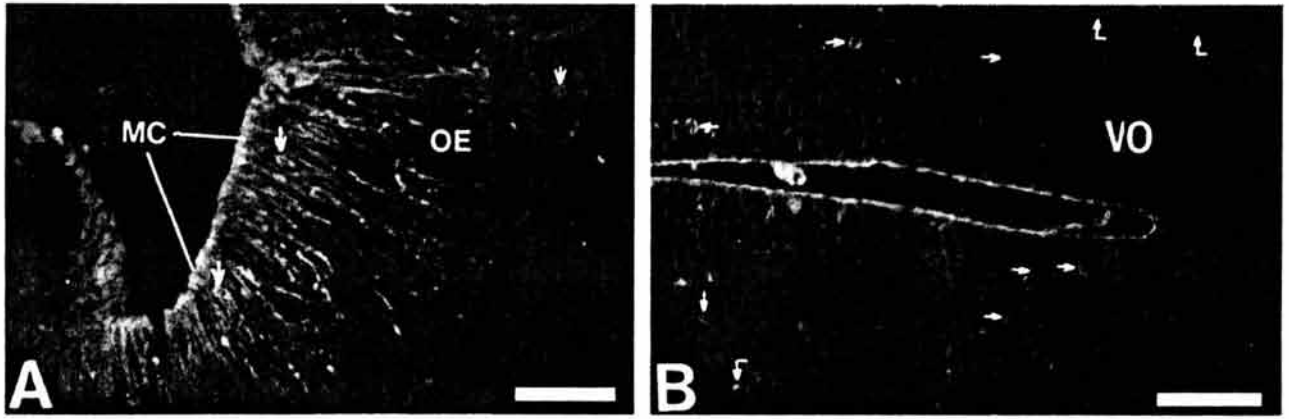


FIG. 3. nNOS immunoreactivity (nNOS-IR) in the nasal cavity of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. (A) Coronal section showing nNOS-IR in the dendrites, some ORN cell bodies (arrows), and mucociliary/microvillar complex (MC) from the olfactory epithelium (OE) of the main chamber. (B) Olfactory epithelium of the vomeronasal organ (VO) showing nNOS-IR in the dendrites and some ORN cell bodies (arrows) as well as in basal cells (curved arrows). (C) Immunoreactive dendrites and dendritic knobs (arrowheads) of ORN at the OE. (D) nNOS-IR in ORN cell bodies (arrows), dendrites, and dendritic knobs (arrowheads) at the main chamber. (E) nNOS-IR in the Bowman's glands (BG). Scale bars: 50 μm for A; 120 μm for B; 30 μm for C and D; and 100 μm for E.

FIG. 4. Coronal sections of the nasal cavity of axolotls. (A) Intense NADPH-d staining of small cells (arrows) of the respiratory epithelium (RE) and (B) nNOS-IR in the same small cells of the RE (arrows). Scale bar: 50 μm .

nNOS-IR in olfactory receptor neurons from the OE of both juvenile and neonetic adult axolotls.

ORN of axolotls exhibit intense NADPH-d labeling in the cell body, dendrite, and axon. Intense nNOS-IR occurs in the dendrite and dendritic knobs and in some ORN cell bodies and axon hillocks. The localization of NADPH-d staining and nNOS-IR in the ORN of the OE of the axolotl is in line with the proposed role of NO, by some authors, in olfactory signal transduction in other species (17, 24, 27). However, from those works, only Zielinski *et al.* (24) reported both NADPH-d staining and NOS-IR in the ORN of the larval sea lamprey *Petromyzon marinus*. In other species like rat, catfish, or humans, the presence of NADPH-d staining in the ORN has been reported, but nNOS-IR could not be found (20, 45). There are several factors that might underlie the lack of nNOS label in those works: (i) The histochemical and immunohistochemical techniques employed by the different research groups might differ in their specificity, sensitivity, and/or show particularities. (ii) Mature olfactory neurons might express enzyme isoforms slightly different from those of the nNOS against which the specific antibody was developed and consequently cannot be detected. At this point, we should mention that in the present work different NOS antibody dilutions were needed to be able to obtain immunoreactivity in olfactory tissue (1:100) and brain (1:500 to 1:20,000) of the axolotl *A. mexicanum* (see Experimental Procedures). These data suggest either a differential sensitivity to the enzyme antibody between these tissues or a lower concentration of the enzyme in olfactory tissue. (iii) The histochemical NADPH-d label obtained in some species could result from the action of an oxidoreductase enzyme different from NOS. This occurs when the tissue is not fixed at a proper paraformaldehyde concentration and the postfixation time is not adequate. Paraformaldehyde fixation presumably inactivates all oxidative NADPH-dependent enzymes except for NOS (36, 38, 39, 67).

Nevertheless, there is biochemical (20) and physiological evidence showing that NO is present in the OE of several species and that this molecule plays a role in olfactory transduction. Thus, electrophysiological studies on ORN membrane receptors of *Xenopus laevis* (27), as well as stimulation of olfactory

cilia of rat and catfish isolated olfactory tissue (17, 26) with high concentrations of odors, have been found to induce a rapid increase in cAMP or IP3 levels as well as a delayed and sustained elevation of the cGMP concentration. The odorant-induced cGMP response is abolished by L-N^G-nitro-arginine, a selective inhibitor of NO synthesis, as well as by hemoglobin, which efficiently binds to and inactivates nitric oxide. Moreover, during electroolfactographic (EOG) recording at the nasal epithelium of lamprey larvae, L-arginine administration, the precursor of NO, induces a potent response in the EOG recording, while application of a NOS inhibitor, N^w-n-L-arginine, causes a striking decrease in the responses (24). Together these data suggest a clear NO-mediated modulation of the olfactory responses in several species.

The fact that both NOS-IR and NADPH-d staining are found in two species in a developing state, like the axolotl (present data) and the lamprey larvae (24), suggests that the development stage might be a factor contributing to the detection of both marks. This conclusion is based on the fact that nNOS-IR has not been detected in the ORN of adult vertebrates (18, 20, 23, 45, 47, 50), but is found at early stages of development and after injury or bulbec-tomy in adult rats in the basal cells undergoing differentiation to olfactory receptor neurons. These differentiation periods (development and regeneration) coincide with an elevation of mRNA and NOS protein expression shown by immunoblot and Northern blot techniques (53). In line with this interpretation, we have found that in the axotomized side of axolotls, the OE exhibits an increase in NADPH-d- and NOS-IR-positive basal cells at 2 weeks postaxotomy (Figs. 5A and 5B).

Both bulbectomy and axotomy of the olfactory nerve produce retrograde degeneration of ORN at the nasal epithelium. When the afferents to the olfactory bulb are cut, their axons degenerate and neuronal death follows (60–66, 68). In the present work, this procedure was used to verify that the positive cells found after histochemical and immunohistochemical procedures were ORN. The results obtained confirm that the histological labels correspond to ORN, since 2 weeks after axotomy, when the majority of mature neurons degenerate and die, an important decrease in both nNOS-IR and

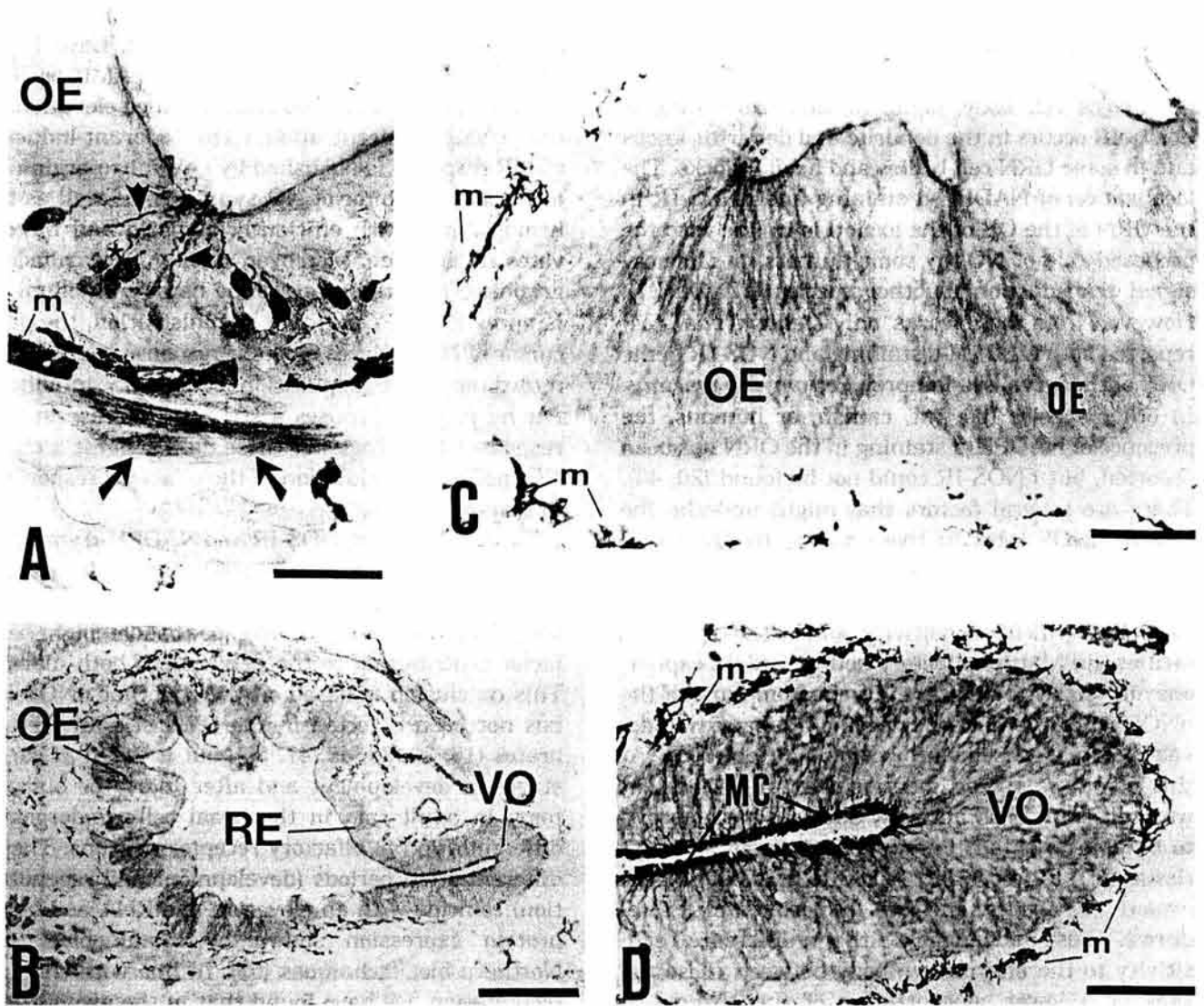


FIG. 5. Coronal sections of the nasal cavity of axotomized axolotls after histochemical NADPH-d staining. (A) Olfactory epithelium (OE) of the main chamber showing a few NADPH-d positive ORN 2 weeks after axotomy. Notice the nuclei with signs of chromatolysis (asterisk), the curly dendrites (arrowheads), and the granular NADPH-d staining in the nervous fiber bundles (arrows); m, melanocytes. (B) Panoramic view of a main chamber at 5 weeks postaxotomy. No NADPH-d staining is observed, indicating the absence of ORN. (C, D) Olfactory epithelium of the main chamber and the vomeronasal organ (VO), respectively, 5 weeks after axotomy. NADPH-d staining is lacking in ORN but remains spared in the mucociliary/microvillar complex (MC); m, melanocytes. Scale bars: 50 μm for A, 550 μm for B, 48 μm for C, and 150 μm for D.

NADPH-d staining is found in the OE of the nasal cavity and the vomeronasal organ. Labels are almost confined to basal cells and immature ORN. However, 5 weeks after axotomy, both marks in ORN are almost totally lost. One possible explanation for this last finding is that after injury the epithelium initiates regeneration (2 weeks) but that

at a certain point of this process the presence of a target to establish contact is needed. In its absence the regenerating cells finally degenerate, too (53, 69). In support of the notion that NO might play a role in the maturation of these neurons are recent data from our group showing both NOS-IR and NADPH-d staining in immature ORN of the axolotl

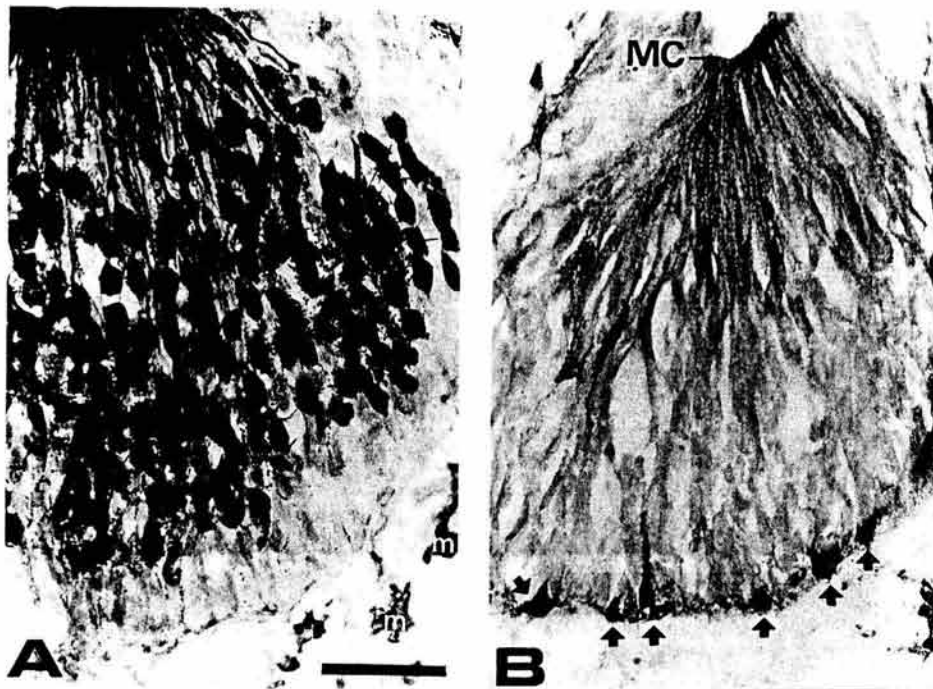


FIG. 6. Coronal sections of the nasal chamber showing the olfactory epithelium of control and axotomized sides of the axolotl, 2 weeks after axotomy. (A) Olfactory receptor neurons of the control side showing intense NADPH-d staining; m, melanocytes. (B) Axotomized side showing a weak staining in dendrites and the mucociliary/microvillar complex (MC). Notice the intense staining of the basal cells in the axotomized side (arrows) when compared with the control side. Scale bar: 40 μm .

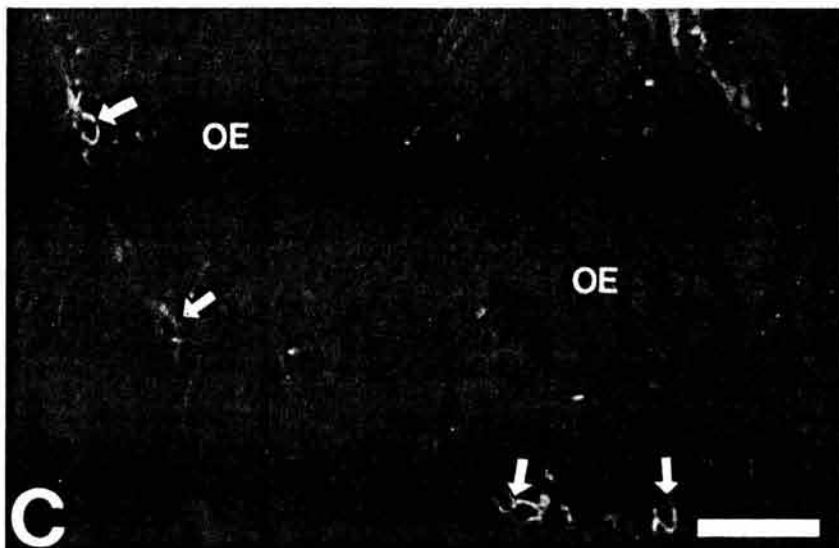
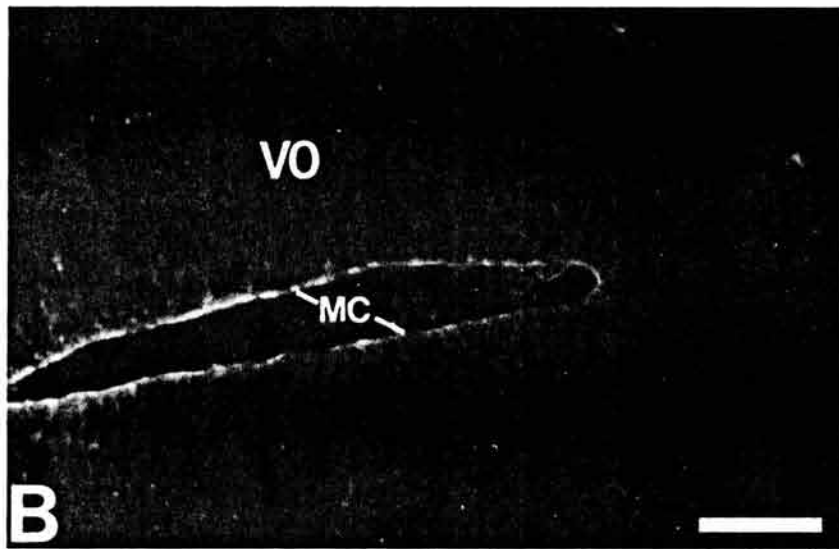
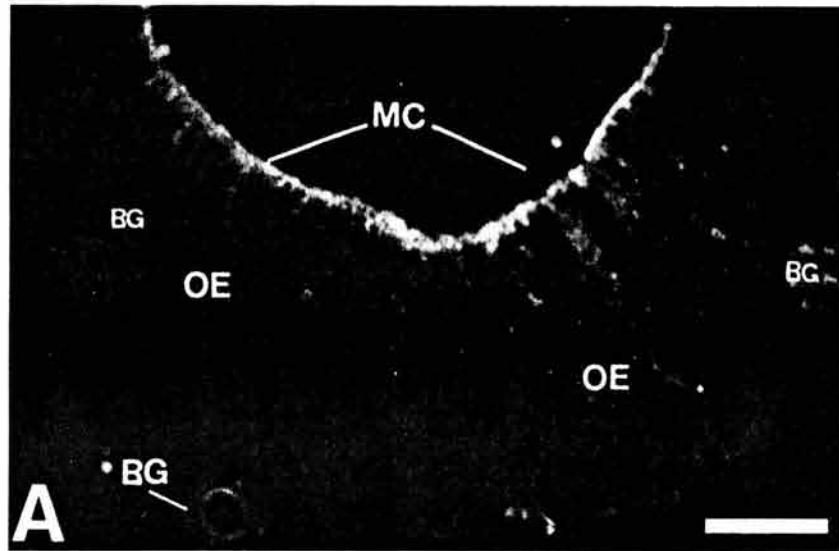
OE at developmental day 12 (manuscript in preparation). Moreover, several groups have reported that NO participates in the establishment and refinement of the axonal projections, the differentiation of motoneurons, and the establishment of neuronal connections (70–75).

In the present work, NOS-IR and NADPH-d staining were also found in OE vessels and Bowman's glands. The occurrence of both labels in nerve fibers of these structures has been reported for other species (47, 49, 51). The presence of NO in the vessels suggests that this molecule might participate in blood flow regulation of the nasal epithelium in the axolotl. This function has been attributed to NO in the nasal cavity of other species (20, 24, 45, 49). Slight NADPH-d staining was also found in fibers

forming a net surrounding the secretory cells of the Bowman's glands. These glands secrete a serum rich in glycoproteins to the surface of the OE (76). Recently, Jeon *et al.* (51) described in the rat that the NADPH-d-positive fibers that surround the nasal epithelium blood vessels and Bowman's glands originate in the sphenopalatine ganglion. Since this ganglion contains cholinergic neurons, NO could be colocalized with acetylcholine and contribute to the vasomotor and secretomotor control in this tissue. On the basis of these data it could be proposed that NO participates in the modulation of Bowman's gland's secretion in the axolotl.

In the respiratory epithelium of the main chamber, small cells showing both NADPH-d staining and NOS-IR (Fig. 4) were detected. These cells have

FIG. 7. nNOS immunoreactivity (nNOS-IR) in the nasal cavity of axolotls 2 weeks after unilateral axotomy. (A) In the main chamber, immunoreactivity in ORN is only present in some dendrites, while in the mucociliary/microvillar complex (MC) and Bowman's glands (BG), nNOS-IR remains spared. (B) In the vomeronasal organ (VO), nNOS-IR is again almost absent in ORN and spared in the MC. (C) Intense immunoreactivity is also seen 2 weeks after axotomy in basal cells at the bottom of the olfactory epithelium (OE) (arrows). Scale bars: 120 μm for A and B and 50 μm for C.



not been described in other anatomical studies of the nasal cavity of the axolotl. To establish the nature and possible function of these NO-positive cells found in the axolotl is a matter of ongoing investigation.

In conclusion, our results demonstrate the presence of an intense NADPH-d staining and nNOS-IR in the ORN of the olfactory epithelium of the main chamber and the vomeronasal organ of the axolotl. nNOS immunoreactivity was mainly localized at the ORN dendrites and the mucociliary/microvillar complexes, at the lamina propria of arterioles and in Bowman's glands secretory and duct cells. Thus, present results suggest that NO might be involved in several functions in the nasal cavity of *A. mexicanum*. These functions appear to include olfactory signal transduction, blood flow regulation, and modulation of Bowman's glands secretion. Additionally, NO seems to play a role in ORN development.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. P. Emson who kindly donated the anti-NOS antibody, Dr. G. Rodríguez-Manzo for translation and criticism of the text, Mr. F. Camacho-García for technical assistance, and Mr. R. Cardoso for illustration. This study was partially supported by the following grants: CONACYT-29151N (for León-Olea) and DGEPPA-UNAM-201377 (for Sánchez-Islas). E. Sánchez-Islas received scholarships from TELMEX and CONACYT.

REFERENCES

- Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109–142.
- Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Science* **257**, 494–496.
- Snyder, S. H., and Bredt, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* **266**, 68–71, 74–77.
- Yun, H. Y., Dawson, V. L., and Dawson, T. T. (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Crit. Rev. Neurobiol.* **10**, 291–316.
- Shinde, U. A., Mehta, A. A., and Goyal, R. K. (2000). Nitric oxide: A molecule of the millennium. *Indian J. Exp. Biol.* **38**, 201–210.
- Gelperin, A. (1994). Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature* **369**, 61–63.
- Sánchez-Alvarez, M., León-Olea, M., Talavera, E., Pellicer, F., Sánchez-Islas, E., and Martínez-Lorenzana, G. (1994). Distribution of NADPH-diaphorase in the periesophageal ganglia of the snail, *Helix aspersa*. *Neurosci. Lett.* **169**, 51–55.
- Müller, U., and Hildebrandt, H. (1995). The nitric oxide/cGMP system in the antennal lobe of *Apis mellifera* is implicated in integrative processing of chemosensory stimuli. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 2240–2248.
- Talavera, E., Martínez-Lorenzana, G., León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Sánchez-Islas, E., and Pellicer, F. (1995). Histochemical distribution of NADPH-diaphorase in the cerebral ganglion of the crayfish *Cambarellus montezumae*. *Neurosci. Lett.* **187**, 177–180.
- Gelperin, A., Kleinfeld, D., Denk, W., and Cooke, I. R. (1996). Oscillations and gaseous oxides in invertebrate olfaction. *J. Neurobiol.* **30**, 110–122.
- Müller, U. (1996). The nitric oxide system in insects. *Prog. Neurobiol.* **51**, 363–381.
- Bicker, G. (1998). NO news from insect brains. *Trends Neurosci.* **21**, 349–355.
- Colasanti, M., and Venturini, G. (1998). Nitric oxide in invertebrates. *Mol. Neurobiol.* **17**, 157–174.
- Ott, S. R., and Burrows, M. (1999). NADPH diaphorase histochemistry in the thoracic ganglia of locusts, crickets, and cockroaches: Species differences and the impact of fixation. *J. Comp. Neurol.* **410**, 387–397.
- Gelperin, A., Flores, J., Raccaia-Behling, F., and Cooke, I. R. (2000). Nitric oxide and carbon monoxide modulate oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. *J. Neurophysiol.* **83**, 116–127.
- Davis, B. J. (1991). NADPH-diaphorase activity in the olfactory system of the hamster and rat. *J. Comp. Neurol.* **314**, 493–511.
- Breer, H., Klem, T., and Boekhoff, I. (1992). Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system. *Neuroreport* **3**, 1030–1032.
- Kishimoto, J., Keverne, E. B., Hardwick, J., and Emson, P. C. (1993). Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: A histochemical, immunological and *in situ* hybridization study. *Eur. J. Neurosci.* **5**, 1684–1694.
- León-Olea, M., Sánchez-Alvarez, M., Pellicer, F., Talavera, E., Sánchez-Islas, E., and Martínez-Lorenzana, G. (1994). Distribution of nitric oxide producing neurons in the CNS of the axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Abstr. Neurosci.* **20**, 1173.
- DellaCorte, C., Kalinoski, D. L., Huque, T., Wysocki, L., and Restrepo, D. (1995). NADPH diaphorase staining suggests localization of nitric oxide synthase within mature vertebrate olfactory neurons. *Neuroscience* **66**, 215–225.
- Broillet, M. C., and Firestein, S. (1996). Gaseous second messengers in vertebrate olfaction. *J. Neurobiol.* **30**, 49–57.
- Hopkins, D. A., Steinbusch, H. W., Markerink, van Ittersum, M., and De Vente, J. (1996). Nitric oxide synthase, cGMP, and NO-mediated cGMP production in the olfactory bulb of the rat. *J. Comp. Neurol.* **375**, 641–658.
- Porteros, A., Arévalo, R., Crespo, C., Briñón, G. J., Weruaga, E., Aijón, J., and Alonso, J. R. (1996). Nitric oxide synthase

- activity in the olfactory bulb of anuran and urodele amphibians. *Brain Res.* **724**, 67–72.
24. Zielinski, B. S., Osahan, J. K., Hara, T. J., Hosseini, M., and Wong, E. (1996). Nitric oxide synthase in the olfactory mucosa of the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *J. Comp. Neurol.* **365**, 18–26.
 25. Wenisch, S., Andressen, C., Derouiche, A., Arnhold, S., Addicks, K., and Leiser, R. (2000). Heme oxygenase-2 and nitric oxide synthase immunoreactivity of bovine olfactory receptor neurons and a comparison with the distribution of NADPH-diaphorase staining. *Histochem. J.* **32**, 381–388.
 26. Breer, H., and Shepherd, G. M. (1993). Implication of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends Neurosci.* **16**, 5–9.
 27. Lischka, F. W., and Schild, D. (1993). Effects of nitric oxide upon olfactory receptor neurones in *Xenopus laevis*. *NeuroReport* **4**, 582–584.
 28. Inamura, K., Kashiwayanagi, M., and Kurihara, K. (1998). Effects of cGMP and sodium nitroprusside on odor responses in turtle olfactory sensory neurons. *Am. J. Physiol.* **275**, C1201–C1206.
 29. Schmachtenberg, O., and Bacigalupo, J. (2000). Calcium mediates the NO-induced potassium current in toad and rat olfactory receptor neurons. *J. Membr. Biol.* **175**, 139–147.
 30. Menzel, R., and Muller, U. (1996). Learning and memory in honeybees: From behavior to neural substrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 379–404.
 31. Kendrick, K. M., Guevara-Guzman, R., Zorrilla, J., Hinton, M. R., Broad, K. D., Mimmack, M., and Ohkura, S. (1997). Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature* **388**, 670–674.
 32. Thomas, E., and Pearse, A. (1961). The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemie* **2**, 266–282.
 33. Vincent, S. R. (1986). NADPH-diaphorase histochemistry and neurotransmitter coexistence. In *Neurohistochemistry: Modern Methods and Applications* (Panula, P., Paivrinta, H., and Soinila, S., Eds.), pp. 375–396. A. R. Liss, New York.
 34. Vincent, S. R., and Kimura, H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* **46**, 755–784.
 35. Rodrigo, J., Springall, D. R., Uttenthal, O., Bentura, M. L., Abadia-Molina, F., Riveros-Moreno, V., Martinez-Murillo, R., Polak, J. M., and Moncada, S. (1994). Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **345**, 175–221.
 36. Dawson, T. M., Bredt, D. S., Fotuhi, M., Hwang, P. M., and Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in the brain and peripheral tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7797–7801.
 37. Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M., and Vincent, S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2811–2814.
 38. Bredt, D. S., and Snyder, S. H. (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**, 3–11.
 39. Matsumoto, T., Nakane, M., Pollock, J. S., Kuk, J. E., and Förstermann, U. (1993). A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci. Lett.* **155**, 61–64.
 40. Holmqvist, B. I., Ostholm, T., Alm, P., and Ekström, P. (1994). Nitric oxide synthase in the brain of a teleost. *Neurosci. Lett.* **171**, 205–208.
 41. Brüning, G., Katzbach, R., and Mayer, B. (1995). Histochemical and immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* **358**, 353–382.
 42. González, A., Muñoz, A., Muñoz, M., Marín, O., Arévalo, R., Porteros, A., and Alonso, J. R. (1996). Nitric oxide synthase in the brain of a urodele amphibian (*Pleurodeles walt*) and its relation to catecholaminergic neuronal structures. *Brain Res.* **727**, 49–64.
 43. Smeets, W. J., Alonso, J. R., and Gonzalez, A. (1997). Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in relation to catecholaminergic neuronal structures in the brain of the lizard *Gekko gekko*. *J. Comp. Neurol.* **377**, 21–41.
 44. Brüning, G., Wiese, S., and Mayer, B. (1994). Nitric oxide synthase in the brain of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J. Comp. Neurol.* **348**, 183–206.
 45. Kulkarni, A. P., Getchell, T. V., and Getchel, M. L. (1994). Neuronal nitric oxide synthase is localized in extrinsic nerves regulating perireceptor processes in the chemosensory nasal mucosae of rats and humans. *J. Comp. Neurol.* **345**, 125–138.
 46. Brüning, G., and Mayer, B. (1996). Localization of nitric oxide synthase in the brain of the frog, *Xenopus laevis*. *Brain Res.* **741**, 331–343.
 47. Sakai, M., Sawada, T., Nishimura, T., and Nagatsu, I. (1996). Expression of nitric oxide synthase in the mouse and human nasal mucosa. *Acta Histochem. Cytochem.* **29**, 177–179.
 48. Riederer, A., Held, B., Mayer, B., and Worl, J. (1999). Histochemical and immunocytochemical study of nitrenergic innervation in human nasal mucosa. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **108**, 869–875.
 49. Hanazawa, T., Motosugi, H., Konno, A., Kaneko, T., Tanaka, K., and Chiba, T. (1993). Distribution of NADPH-diaphorase positive nerve fibers in the rat nasal mucosa. *Neurosci. Lett.* **159**, 71–74.
 50. Hanazawa, T., Konno, A., Kaneko, T., Tanaka, K., Ohshima, H., Esumi, H., and Chiba, T. (1994). Nitric oxide synthase-immunoreactive nerve fibers in the nasal mucosa of the rat. *Brain Res.* **657**, 7–13.
 51. Jeon, S. Y., Kim, J., and Hwang, E. G. (1997). Origin and distribution of NADPH diaphorase-positive nerves in rat nasal mucosa. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **106**, 688–692.
 52. Sánchez-Islas, E., Anton B., and León-Olea, M. (1999). Anatomical distribution of the nitric oxide synthase and

- NADPH-d in the development of the CNS of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Abs. Neurosci.* **25**, 1019.
53. Roskams, A. J., Bredt, D. S., Dawson, T. M., and Ronnett, G. V. (1994). Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. *Neuron* **13**, 289–299.
 54. Smith, M., and Smith, B. (1971). Analysis of the literature on the Mexican Axolotl. Synopsis of the Herpetofauna of Mexico, Vol. 1, Eric Lundberg, Augusta, WV.
 55. Eisthen, L. H., Sengelaub, D. R., Schroeder, D. M., and Alberts, J. R. (1994). Anatomy and forebrain projections of the olfactory and vomeronasal organs in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Brain Behav. Evol.* **44**, 108–124.
 56. Getchell, T. V., Margolis, F. L., and Getchell, M. L. (1984). Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog. Neurobiol.* **23**, 317–345.
 57. Graziadei, P. P., and Monti Graziadei, G. A. (1976). Olfactory epithelium of *Necturus maculosus* and *Ambystoma tigrinum*. *J. Neurocytol.* **5**, 11–32.
 58. Caggiano, M., Kauer, J. S., and Hunter, D. D. (1994). Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: A lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* **13**, 339–352.
 59. Herbison, A. E., Simonian, S. X., Norris, P. J., and Emson, P. C. (1996). Relationship of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J. Neuroendocrinol.* **8**, 73–82.
 60. Graziadei, P. P., and DeHan, R. S. (1973). Neuronal regeneration in frog olfactory system. *J. Cell Biol.* **59**, 525–553.
 61. Graziadei, G. A., and Graziadei, P. P. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J. Neurocytol.* **8**, 197–213.
 62. Graziadei, P. P., and Okano, M. (1979). Neuronal degeneration and regeneration in the olfactory epithelium of pigeon following transection of the first cranial nerve. *Acta Anat. (Basel)* **104**, 220–236.
 63. Graziadei, P. P., Karlan, M. S., Graziadei, G. A., and Bernstein, J. J. (1980). Neurogenesis of sensory neurons in the primate olfactory system after section of the fila olfactoria. *Brain Res.* **186**, 289–300.
 64. Graziadei, P. P. C., and Monti Graziadei, G. A. (1980). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat. *J. Neurocytol.* **9**, 145–162.
 65. Wang, R. T., and Halpern, M. (1982). Neurogenesis in the vomeronasal epithelium of adult garter snakes. 2. Reconstitution of the bipolar neuron layer following experimental vomeronasal axotomy. *Brain Res.* **237**, 41–59.
 66. Doucette, J. R., Kiernan, J. A., and Flumerfelt, B. A. (1983). Two different patterns of retrograde degeneration in the olfactory epithelium following transection of primary olfactory axons. *J. Anat.* **136**, 673–689.
 67. Yamamoto, R., Bredt, D. S., Snyder, S. H., and Stone, R. A. (1993). The localization of the nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* **54**, 189–200.
 68. Margolis, F. L., Roberts, N., Ferriero, D., and Feldman, J. (1974). Denervation in the primary olfactory pathway of mice: Biochemical and morphological effects. *Brain Res.* **81**, 469–483.
 69. Schwob, J. E., Szumowski, K. E., and Stasky, A. A. (1992). Olfactory sensory neurons are trophically dependent on the olfactory bulb for their prolonged survival. *J. Neurosci.* **12**, 3896–3919.
 70. Gally, J. A., Montague, P. R., Reeke, G. N. Jr., and Edelman, G. M. (1990). The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3547–3551.
 71. Douglas, T. H., Patterson, S. I., Smith, D. S., and Skene, J. H. (1993). Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* **366**, 562–565.
 72. Kalb, R. G., and Agostini, J. (1993). Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development. *Neuroscience* **57**, 1–8.
 73. Williams, C. V., Nordquist, D., and McLoon, S. C. (1994). Correlation of nitric oxide in the elimination of transient retinotectal projections in the developing visual system. *J. Neurosci.* **14**, 1746–1755.
 74. Tenorio, F., Giraldo-Guimaraes, A., and Mendez-Otero, R. (1995). Developmental changes of nitric oxide synthase in the rat superior colliculus. *J. Neurosci. Res.* **42**, 633–637.
 75. Ientile, R., Piccirro, V., Pedale, S., Nucci, C., Malecka, B., Nistico, G., and Macaone, S. (1996). Nitric oxide enhances amino acid release from immature chick embryo retina. *Neurosci. Lett.* **219**, 79–82.
 76. Getchell, M. L., and Getchell, T. V. (1984). β -Adrenergic regulation of the secretory granule content of acinar cells in olfactory glands of the salamander. *J. Comp. Physiol. A* **155**, 435–443.



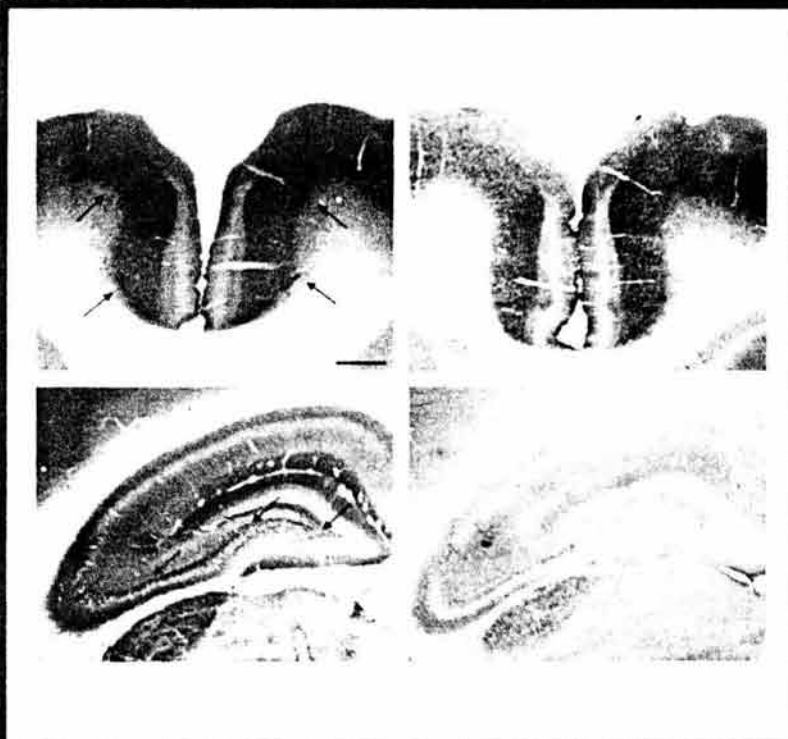
Volume 10, Number 3, May 2004

ISSN 1089-8603

NITRIC **O**XIDE

Biology and Chemistry

Official Journal of the NITRIC OXIDE Society



Also available on

SCIENCE @ DIRECT®

www.sciencedirect.com

NITRIC OXIDE

Biology and Chemistry

Editor-in-Chief

Jack R. Lancaster, Jr.
Birmingham, Alabama

Associate Editor

Ulrich Förstermann
Mainz, Germany

Editorial Advisory Board

Joseph Beckman
Birmingham, Alabama

Timothy R. Billiar
Pittsburgh, Pennsylvania

Christian Bogdan
Freiburg, Germany

Guy C. Brown
Cambridge, United Kingdom

Rudi Busse
Frankfurt, Main, Germany

Gautam Chaudhuri
Los Angeles, California

Hun-Taeg Chung
Chonbug, Korea

Ellen I. Closs
Mainz, Germany

Ted M. Dawson
Baltimore, Maryland

Valina L. Dawson
Baltimore, Maryland

Jean-Claude Drapier
Paris, France

Helmut Drexler
Hannover, Germany

Victor J. Dzau
Boston, Massachusetts

Martin Feelisch
Shreveport, Louisiana

Bruce A. Freeman
Birmingham, Alabama

Jon M. Fukuto
Los Angeles, California

Robert F. Furchgott
Brooklyn, New York

D. Neil Granger
Shreveport, Louisiana

Owen W. Griffith
Milwaukee, Wisconsin

Steven S. Gross
New York, New York

David G. Harrison
Atlanta, Georgia

Matthias W. Hentze
Heidelberg, Germany

John B. Hibbs
Salt Lake City, Utah

James K. Hurst
Pullman, Washington

Larry K. Keefer
Frederick, Maryland

Hartmut Kleinert
Mainz, Germany

Victoria Kolb-Bachofen
Dusseldorf, Germany

Santiago Lamas
Madrid, Spain

Joseph Loscalzo
Boston, Massachusetts

Charles J. Lowenstein
Baltimore, Maryland

Michael A. Marletta
Berkeley, California

Hiroshi Maeda
Kumamoto, Japan

Bettie Sue Masters
San Antonio, Texas

Bernd Mayer
Graz, Austria

Pavel Martasek
Prague, Czech Republic

Thomas Michel
Boston, Massachusetts

Salvador Moncada
London, United Kingdom

Masataka Mori
Kumamoto, Japan

Ferid Murad
Houston, Texas

Carl F. Nathan
New York, New York

Petra M. Schwarz
Mainz, Germany

William C. Sessa
New Haven, Connecticut

Solomon H. Snyder
Baltimore, Maryland

Jonathan S. Stamler
Durham, North Carolina

Dennis J. Stuehr
Cleveland, Ohio

Steven R. Tannenbaum
Cambridge, Massachusetts

Naoyuki Taniguchi
Osaka, Japan

Patrick Vallance
London, United Kingdom

Paul V. Vanhoutte
Courbevoie, France

David A. Wink
Bethesda, Maryland

Mitsuhiro Yokoyama
Kobe, Japan

Warren M. Zapol
Boston, Massachusetts



Nitric oxide synthase inhibition during synaptic maturation decreases synapsin I immunoreactivity in rat brain

Eduardo Sánchez-Islas and Martha León-Olea*

Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica. Subdirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente". Av. México-Xochimilco 1001. Col. San Lorenzo Huipulco, Mexico D.F. C.P. 14370, Mexico

Received 11 November 2003; received in revised form 31 March 2004

Available online 10 May 2004

Abstract

During the development of the brain, nitric oxide and synapsins, the latter being phosphoproteins associated to presynaptic membrane vesicles, are abundant in presynaptic terminals and play important and similar roles in neurotransmitter release, morphogenesis, synaptogenesis, and synaptic plasticity. These mechanisms are fundamental for neuronal development and plasticity and constitute important factors for the formation of neuroanatomical structures. Neural nitric oxide synthase (nNOS), synapsin I, and nNOS adapter protein (CAPON) constitute a ternary complex necessary for specific NO and synapsin functions at a presynaptic level. It is not known whether NO absence may affect the presence and/or activity of synapsins during brain development. To understand the role of NO in synaptogenesis, we studied the effects of NOS inhibition on synapsin I expression at a postnatal stage. Rat pups were treated with a competitive NOS antagonist, *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester, from postnatal days 3 to 23. Control pups received exclusively an equivalent volume of saline solution. Histochemical and immunochemical techniques for NADPH-d and synapsin I, respectively, were carried out. NOS inhibition elicited a significant reduction in synapsin I immunoreactive density and NADPH-d activity in the brain in the analyzed areas—prefrontal cortex, hippocampus, and dorsal thalamus. These data show that the alterations originated by NO and synapsin deficiencies produce a diminution in synaptic density. Thus, functions that depend on the formation of synaptic connections such as learning and memory could be affected by NO deficiency.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: nNOS; NADPH-d; Development; Synaptogenesis; Immunohistochemistry; Hippocampus

Nitric oxide (NO, nitrogen monoxide), a biological messenger molecule with multiple functions in immune, cardiovascular, and nervous systems, is generated by the enzyme nitric oxide synthase (NOS) by means of three distinct isoenzymes: neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), and inducible NOS (iNOS) [1–6]. NO and synapsins, the latter being phosphoproteins associated with presynaptic membrane vesicles, are abundant in neuronal terminals and participate in similar functions in the nervous system such as the regulation of neurotransmitter release [7–12], synaptic plasticity [13], neurite outgrowth and extension [14–17], and synaptogenesis, neuronal proliferation, and maturation [18–29], and play a role in synaptic vesicle docking/fusion reactions

[30,31]. The development of the mechanisms of neurotransmitter release is an important component for the formation of functional synaptic connections. These processes are fundamental for neuronal development and plasticity and are important factors in the formation of neuroanatomical structures [32–36]. Theoretically, the lack of NO would produce important changes in the development of the CNS. However, knockout nNOS mice do not show patent abnormalities in both neuroanatomical and sensorimotor function studies [37,38], suggesting that other NOS isoforms in the brain, like iNOS and eNOS, may generate NO and compensate for the absence of nNOS [37,39]. In vitro studies have shown that nNOS inhibition affects basic aspects of neuronal viability and function [40]. The inhibition of nNOS during critical periods of brain development originates alterations in the development of retinal pathways [41–45]. Kalb and Agostini [18] reported that this inhibition

* Corresponding author. Fax: +5255-56-55-99-80.

E-mail addresses: marthalo@imp.edu.mx (M. León-Olea), edaxy@imp.edu.mx (E. Sánchez-Islas).

causes the absence of protein expression, such as Cat-305, on the neuronal surface present in mature motoneurons of the spinal cord. This inhibition also affects functions such as learning and memory [46]. The delivery of nNOS to discrete sites of neurons is mediated by adapter proteins [47]. For instance, nNOS is linked to postsynaptic densities by the cytoskeletal protein PSD95/93 [48]. This interaction places nNOS adjacent to other PSD95 ligands, such as the NR2 subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) [49], which accounts for the efficient activation of nNOS by NMDA receptor stimulation [50]. Recently, Jaffrey et al. [51] reported that nNOS localization in presynaptic terminals depends on the formation of a ternary complex constituted by nNOS, synapsin I, and a carboxyl terminal PDZ ligand of nNOS protein (CAPON). CAPON contains a C-terminal PDZ domain-binding motif, which interacts with the N-terminal PDZ domain of nNOS. Evidence from binding studies indicates that CAPON is stoichiometrically associated with soluble nNOS, indicating that CAPON may serve as a nNOS-targeting protein in neurons [51]. CAPON has an N-terminal phosphotyrosine-binding (PTB) domain whose ligands include Dexas1 (a novel member of the ras family) and the synapsin family of proteins [51,52]. The physiologic activity of Dexas1 is determined by nNOS and CAPON, as Dexas1 activation is selectively diminished in mice bearing a nNOS targeted deletion, whereas Dexas1 activation by nNOS is enhanced in the presence of CAPON [20]. The absence of synapsin I originates modifications in nNOS and CAPON cellular localizations thus affecting the cellular functions of this ternary complex. Additionally nNOS and synapsins are present in presynaptic sites and partially co-localized in cultured hippocampal neurons [53]. Moreover, *nNOS*^{-/-} mice display defects in dendritic arborization [16], which are similar to the dendritic defects found in synapsin I knockout mice [21]. This evidence suggests a close functional relationship between NO and synapsins allowing the speculation that those deficits in dendritic morphology or neurotransmitter release in synapsin-deficient mice may reflect a decreased access of nNOS to synaptic sites. It is not known whether NO absence may affect the presence and/or activity of synapsins during brain development. To further understand the role of NO in synaptogenesis, we studied the effects of NOS inhibition, during early postnatal stages in rat pups, on synapsin immunoreactive density in cerebral structures related to cognitive functions such as prefrontal cortex, hippocampus, and dorsal thalamus.

Experimental procedures

All experiments were performed according to NIH guidelines for care and use of laboratory animals and

approved by the Project Commission of the Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

Wistar rat pups (both sexes) were housed together with their mothers and maintained under standard laboratory conditions. Pups were treated ($n=7$) from postnatal days 3 to 23 (day of birth being considered as postnatal day 1, pn1) with a daily subcutaneous injection of 60 mg/kg *N*-nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME, Sigma) in isotonic saline (10–50 μ l). Control pups ($n=7$) received an equivalent volume of saline. The pups were weighed and observed daily prior to treatment administration.

We carried out an NADPH-d histochemistry and a synapsin I a/b immunohistochemistry in *L*-NAME- and saline-treated 24-day-old rats. Previously animals were anesthetized with sodium pentobarbital 40 mg/kg i.p. and perfusion-fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (PB). Brains were removed, post-fixed 12–16 h in the same fixative, and washed in 30% sucrose buffer until used. Serial 50 μ m coronal sections of the brain were obtained in a freezing microtome. Alternate slices, corresponding to bregma -4.16 mm [54], were chosen for the procedures (Fig. 2A). Control and treated sections were processed simultaneously for each technique.

NADPH-d histochemistry

Floating sections from both control and treated animals were permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PB for 5 min, NADPH-d activity was revealed by incubation in PB containing 0.1 mg/ml nitro blue tetrazolium and 1 mg β -NADPH for 45 min at 37 °C, subsequently washed in PB, dried, cleared, and mounted as described in detail elsewhere [24,55].

Synapsin I immunohistochemistry

The avidin–peroxidase method (kit PK-6105, Vector, USA) was performed in floating sections incubated in 0.03% hydrogen peroxide (H_2O_2 , 30 min), washed in 0.1 M PB saline (PBS), and incubated (1 h) in PBS with 0.3% Triton X-100 (PBS-T), 1% bovine albumin (BA), and 1% normal rabbit serum (RS). They were then incubated with a primary polyclonal antibody against synapsin I a/b protein (Santa Cruz, USA), diluted 1:600 in PBS-T, 1% RS for 3 days at 4 °C, followed by a rinse in PBS and incubation in biotinylated rabbit anti-goat IgG (Vector, diluted 1:200) for 2 h. After further washing in PBS, the sections were incubated in avidin–biotin–peroxidase complex for 1 h. The peroxidase activity was revealed by reacting the sections with a mixture of 10 mg 3,3-diaminobenzidine in 26 ml Tris–HCl buffered saline (5 μ M, pH 7.6), 12 μ l H_2O_2 30%, and 300 μ l nickel sulfate

30%. Subsequently, the sections were washed in PBS, dried, cleared, and mounted.

Quantitative tissue analysis for NADPH-d histochemistry and immunohistochemistry

The optical density of both immunoreactivity and histochemistry staining in prefrontal cortex, hippocampal subregions, and dorsal thalamus sections was analyzed by a computer-based image-analysis system as an average of gray values. Sections were analyzed under a Leitz Laborlux 12 microscope and photographed using a SPOT 2 camera (Diagnostic Instruments), captured and digitized in a PC computer. Measurements were taken from coronal sections of the right and left hemispheres of selected regions (described in Fig. 2A), in two alternate sections (one for NADPH-d and one for synapsin I) for each animal ($n = 14$). Optical density of positive areas was quantified using a Scion Image 4.0.2 analysis program and standardized between white (0) and black (255). For each cerebral region, the mean of the optical densities in the control group was taken as 100%. In the case of NADPH-d histochemistry, we also measured the optical density in randomly chosen soma neurons in the same regions to quantify changes in staining intensity. The optical density of the same number of control and treated neurons was measured with the above-mentioned software. The total number of cells processed in the different regions was: 121 in prefrontal cortex, 174 in hippocampus, and 246 in ventral lateral geniculate nuclei of dorsal thalamus.

Statistical analysis

Weight differences between control and treated animals were assessed by means of a two-way ANOVA for repeated measures followed by the Tukey test.

Data regarding quantification of the optic density from the histochemical and immunohistochemical experiments are presented as means \pm SEM. Statistical comparisons of these data between L-NAME-treated and control groups were performed by means of the paired Student's *t* test, the optic density of neurons was evaluated by means of the Mann–Whitney *U* test. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.

Results

Pups treated postnatally with L-NAME on days 3–23 presented a moderate weight diminution with age as compared to control animals, [two-way ANOVA for treatment $F_{(1,20)} = 28.9$, $p < 0.001$, for postnatal age $F_{(4,80)} = 449.9$, $P < 0.001$, and for the interaction between

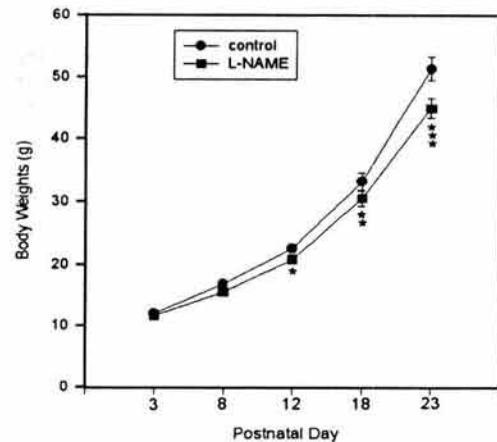


Fig. 1. Body weight development along time in L-NAME treated (60 mg/kg, subcutaneous, daily from P3 through P23) and control (saline)-injected rat pups. Values are given as means \pm SEM Tukey test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

both factors $F_{(4,80)} = 8.66$, $P < 0.001$]. The diminution became statistically significant from P12 onwards, being the decrease in body weight of a 15% in average at the end of the L-NAME treatment (P23) (Fig. 1). No other evident macroanatomic or motor activity alterations were noticed.

NADPH-d histochemistry

Inhibition of nNOS activity in brain sections of the treated group resulted in a reduction in the number of NADPH-d positive neurons and fibers, as well as in a diminution in the labeling intensity when compared to control group (100%). Prefrontal cortex presented a staining intensity $42.83 \pm 5.03\%$ (i.e., a decrease of 57.17% of the control value) (Figs. 2B and 3A and B) and a soma optical density ($n = 121$) equal to $56.17 \pm 1.96\%$ (Fig. 2C). The hippocampus exhibited also a low staining intensity of $43.39 \pm 2.74\%$ (Figs. 2B and 3C and D). The optical density of neuronal bodies in the hippocampus ($n = 174$) was only measured in 4 of the 7 treated pups, because labeled neurons were completely absent in this region in the 3 remaining animals. The mean optical density for these animals was $43.89 \pm 1.32\%$ (Figs. 2C and 3D). The dorsal thalamus presented an optical density of $46.28 \pm 4.65\%$ (Figs. 2B and 3E and F) and the mean value obtained for the somas in the ventral lateral geniculate nuclei ($n = 246$) was $42.20 \pm 1.32\%$ (Figs. 2C and 3G and H).

Synapsin immunohistochemistry

A significant reduction in synapsin I immunoreactivity was found in the three selected brain areas of the

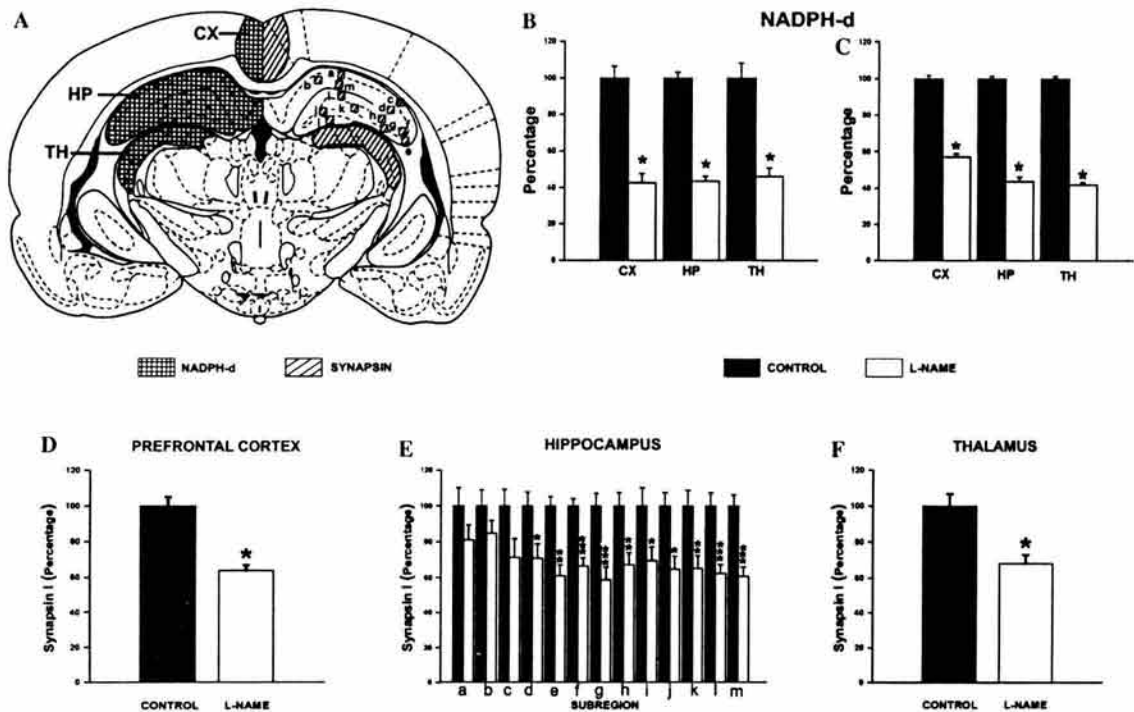


Fig. 2. Quantitative analysis of NADPH-d staining and synapsin I immunoreactivity in 24-day-old rat pups treated with L-NAME from postnatal days 3–23 and control pups (saline solution). (A) Schematic drawing showing quantified brain regions. NADPH-d staining is shown on the left side of the drawing in prefrontal cortex (CX), hippocampus (HP), and thalamus (TH). Synapsin I immunoreactivity is shown on the right side of the drawing in CX, HP (quantified by subregions): (a) CA1 stratum oriens; (b) CA1 stratum radiatum; (c) CA2 stratum oriens; (d) CA2 stratum radiatum; (e) CA3a stratum oriens; (f) CA3a stratum lucidum; (g) CA3b stratum oriens; (h) CA3b stratum lucidum; (i) granular cell layer of dentate gyrus; (j) hilus; (k) polymorphic zone of dentate gyrus; (l) stratum lacunosum-moleculare; and (m) inner layer of dentate gyrus and TH. (B,C) Graphs showing the effect of NOS inhibition on NADPH-d staining in the three selected brain regions (B) and in the somas within these regions (C). Both cases show a significant decrease in staining intensity. (D–F) Effect of nNOS inhibition on synapsin I immunoreactivity in CX, HP, and TH, respectively. A significant decrease in staining intensity is found in the three analyzed regions, except for the hippocampal subregions a, b, and c. Graph values represent the means \pm SEM of all density values for a specific group (7 rats, 1 slide per rat) expressed as percentage of control. Student's *t* test for brain regions **p* < 0.05, ***p* < 0.005, and ****p* < 0.001; Mann–Whitney *U* test for somas (C) **p* < 0.05.

treated group (Table 1). Prefrontal cortex showed an optical density $65.15 \pm 2.57\%$ of the control value (100%) (Figs. 2D and 4A and B). The hippocampus was quantified in subregions (Fig. 2A), and all the values in parentheses are given with respect to control values as follows: polymorphic zone of the dentate gyrus ($65.52 \pm 2.57\%$), hilus ($64.87 \pm 7.32\%$); and stratum lucidum in areas CA3a ($61.28 \pm 5.98\%$) and CA3b ($58.89 \pm 6.94\%$); stratum oriens in areas CA3a ($66.59 \pm 4.61\%$) and CA3b ($67.18 \pm 6.88\%$). Other hippocampal regions where synapsin density is normally low also exhibited a significant reduction in immunoreactivity when compared to control values as follows: stratum oriens in area CA2 ($71.53 \pm 10.31\%$), granular cell layer area of dentate gyrus ($69.61 \pm 7.86\%$), stratum lacunosum-moleculare ($62.67 \pm 4.86\%$), and inner layer of dentate gyrus ($61.08 \pm 5.05\%$) (Figs. 2E and 4C, D, G, and H). Finally, synapsin immunoreactivity in the dorsal thalamus was $66.61 \pm 4.76\%$ of control value (Figs. 2F and 4E and F).

Discussion

Several groups have used the labeling of synapsins as an index of synaptic number and density that may be related to the gain or loss of functions [25,56,57]. The strength of this assumption is based on the following evidence. Synapsins represent one of the most abundant families of synaptic proteins in the brain [58–60]. They are expressed only in neurons and are specifically localized in the presynaptic compartment of the synapsis [61–65]. During the development of the nervous system, the appearance of the synapsin I protein in the neuropil correlates temporarily and topographically with synaptogenesis [56,62,66–69]. Studies of synapsin expression have revealed that an increase in synapsin I and synapsin II levels parallels the establishment of synaptic contacts in different brain areas both in situ and in cultured neurons [56,66,70]. Injections of synapsin I or synapsin II into spinal neurons of *Xenopus* embryos result in the acceleration of both morphological and functional

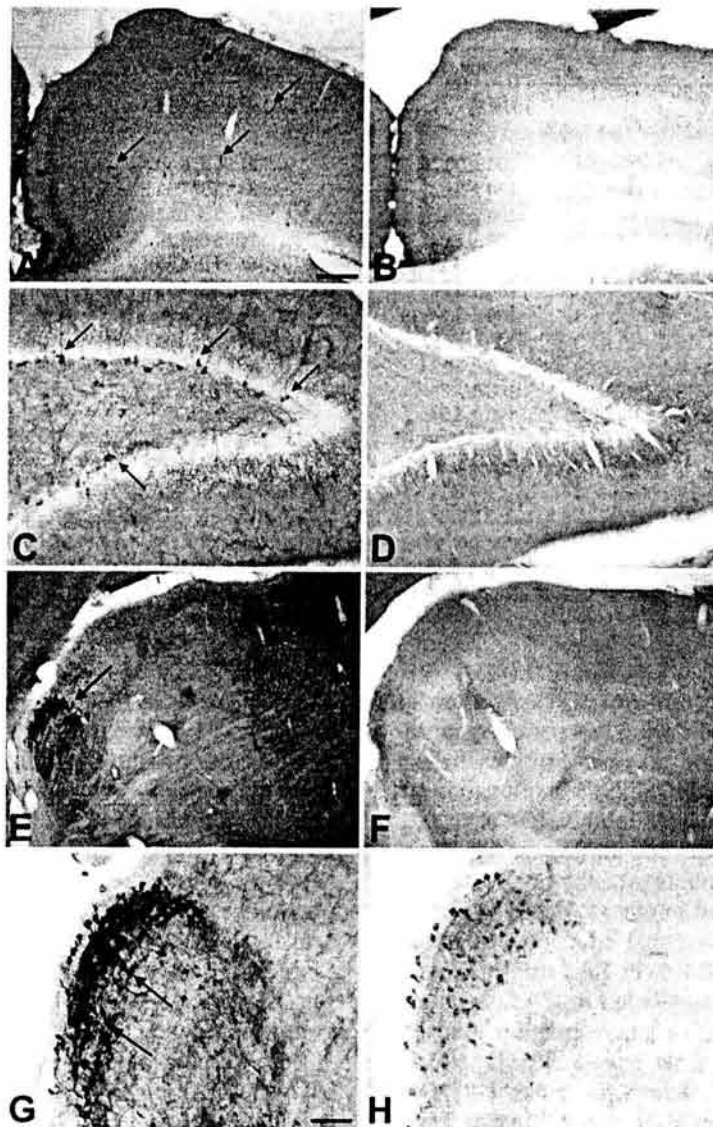


Fig. 3. NADPH-d histochemistry. Photomicrographs of brain coronal sections (50 μ m) of 24-day-old rat pups treated with L-NAME from postnatal days 3–23 and controls (saline solution). Sections in A, C, E, and G correspond to the control group and those in B, D, F, and H to the treated group. Prefrontal cortex (A,B); hippocampus (hilus) (C,D); dorsal thalamus (E,F); and magnification of geniculate nucleus area (G,H). Arrows (\uparrow) show stained neurons and fibers. Sections in the treated group (right) exhibit a decrease in staining intensity when compared with control sections (left). Notice the complete absence of stained neurons in hippocampus (D) and the reduction in staining intensity of positive somas in the geniculate nucleus (H). Scale bars for A–F = 350 μ m; for G–H = 50 μ m.

development of neuromuscular synapses [71–73]. In synapsin I knockout mice, there is a decrease in the size of synaptic terminals and in the number of synaptic vesicles per terminal [21]. Thus, Melloni et al. [56] suggested that examination of synapsin I immunoreactivity in the brain may be used as a sensitive indicator of the establishment/maintenance and/or the loss/recovery of functional synapses in the CNS. Based on the aforementioned studies, we utilized synapsins as markers of synaptic density. Similar to synapsins, NO participation in synaptogenesis [20,21,27,29], regulation of neurotransmitter release [7–11,31], and synaptic plasticity [13] has

been demonstrated. This functional similarity suggests a close relationship between NO and synapsins. Specificity of NO reactions with its neuronal target is partially determined by nNOS availability and precise cellular localization [47–51]. The discovery of the CAPON protein by Jeffrey et al. [51], which binds nNOS and synapsins at the presynaptic site to form a triad, provides evidence for the functional relationship between these proteins. The lack of synapsin I originates modifications in nNOS and CAPON cellular localization, thus affecting the cellular functions of this ternary complex. We were interested in elucidating whether NOS

Table 1
Quantitative tissue analysis for synapsin I immunoreactivity

Cerebral structure	Control (%)	L-NAME (%)	Decrease (%)
Prefrontal cortex	100 ± 5.73	65.15 ± 2.60	34.85 ± 2.60
<i>Hippocampus</i>			
CA1 stratum oriens	100 ± 10.28	81.06 ± 8.40	18.94 ± 8.40
CA1 stratum radiatum	100 ± 9.02	84.75 ± 7.35	28.47 ± 7.35
CA2 stratum oriens	100 ± 9.34	71.53 ± 10.31	28.47 ± 10.31
CA2 stratum radiatum	100 ± 8.04	70.88 ± 8.28	29.12 ± 8.28
CA3a stratum oriens	100 ± 4.25	66.59 ± 4.61	33.41 ± 4.61
CA3a stratum lucidum	100 ± 5.36	61.28 ± 5.98	38.72 ± 5.98
CA3b stratum oriens	100 ± 7.84	67.18 ± 6.88	32.82 ± 6.88
CA3b stratum lucidum	100 ± 7.19	58.89 ± 6.94	41.11 ± 6.94
Granular cell layer of dentate gyrus	100 ± 10.24	69.61 ± 7.86	30.39 ± 7.86
Hilus	100 ± 7.84	64.87 ± 7.32	35.13 ± 7.32
Polymorphic zone of dentate gyrus	100 ± 8.94	65.52 ± 6.87	34.48 ± 6.87
Stratum lacunosum-moleculare	100 ± 7.49	62.67 ± 4.86	37.33 ± 4.86
Inner layer of dentate gyrus	100 ± 6.46	61.08 ± 5.05	38.92 ± 5.05
Thalamus	100 ± 6.96	66.71 ± 4.76	33.29 ± 4.76

Optic density of synapsin I immunoreactivity in different brain regions of rat pups in control (saline) and L-NAME groups, treated from postnatal days 3 to 23 and sacrificed on day 24. The mean of the optical densities of the control group was taken as 100%. Decreases in optical density were observed in all analyzed cerebral regions of the treated group. Values of the treated group are expressed as percentage of control.

inhibition exerted an effect on synapsin expression at early postnatal stages, since during this period synaptogenesis and brain maturation take place in areas where synapsin [56,66,69,70] and nNOS [22,29] expressions are high. Our results show that NOS inhibition at a postnatal stage (days 3–23) in the rat induces a significant decrease in synapsin I immunoreactivity in all analyzed brain regions. Moreover, an important density decrease was found in every hippocampal subregion examined that ranged from 18.94 ± 8.40% in CA1 striatum oriens to a 41.11 ± 6.94% of control value in CA3b striatum lucidum (Table 1, Fig. 2E). The above-mentioned nuclei, which are rich in these proteins, have a close functional relation to learning and memory processes [74]. Our results suggest that NOS inhibition may have an effect on synaptic formation, since there is a significant decrease in its density. This decrease might reflect both the effects of the local disruption of NOS activity as well as possible effects secondary to functional alterations due to the inhibition of the different NOS isoforms at a peripheral level.

On the one hand, NO at the synaptic level behaves as a retrograde neurotransmitter to maintain the activity in the presynaptic neuron, although its synthesis occurs in the postsynaptic neuron. On the other hand, NO in the presynaptic neuron facilitates neurotransmitter release [7–11,31]. When the presynaptic neuron is inactive, synapsins are bound to the cytoskeleton by actin (reserve pool), but when the neuron is activated, synapsins are phosphorylated and become part of the release vesicles located in the vicinity of the presynaptic membrane [31,65]. To form the CAPON/synapsin/NO triad, synapsins must be phosphorylated. This triad keeps

nNOS available at the presynapsis [51]. NO absence not only affects synapsins at the synaptic vesicles, but also modifies the activation at the core complex of other synaptic proteins (n-secl, syntaxin 1a, VAMP 2, and SNAP-25) involved in the docking and fusion of synaptic vesicles [31] and inhibits the calcium-independent neurotransmitter release [10]. This suggests that physiological alterations due to NO absence, which are similar to the ones originated by synapsin deficiency, stem from an unavailability of the enzyme at the synaptic terminal, affecting neurotransmitter release and synaptic plasticity.

NOS chronic inhibition originated a marked decrease in NADPH-d positive staining, which entails nNOS enzymatic activity [38]. It has been reported that L-NAME inhibition affects NOS isoforms differentially, being the endothelial and inducible forms influenced to a lesser degree than the neuronal NOS, which is largely affected [75]. Virgili et al. [40] reported that with this L-NAME treatment (60 mg/kg/day, sub-dermal and postnatally applied) complete inhibition of NOS catalytic activity was attained during its administration, but four days after the end of treatment, the enzyme activity was restored. With this same treatment, we did not find any evident neuromorphological impairment, macroscopic malformation or mortality. Prickaerts et al. [76] reported that a sub-dermal 25 mg/kg/day L-NAME dose, started on postnatal day 1 (P1), originated a high mortality during the first days after birth (P1–P3). We initiated the L-NAME treatment (60 mg/kg/day) on day P3 and, even though the dosage was higher, 100% of our animals survived. It is important to mention that although we did not conduct specific experiments to test motor behavior,

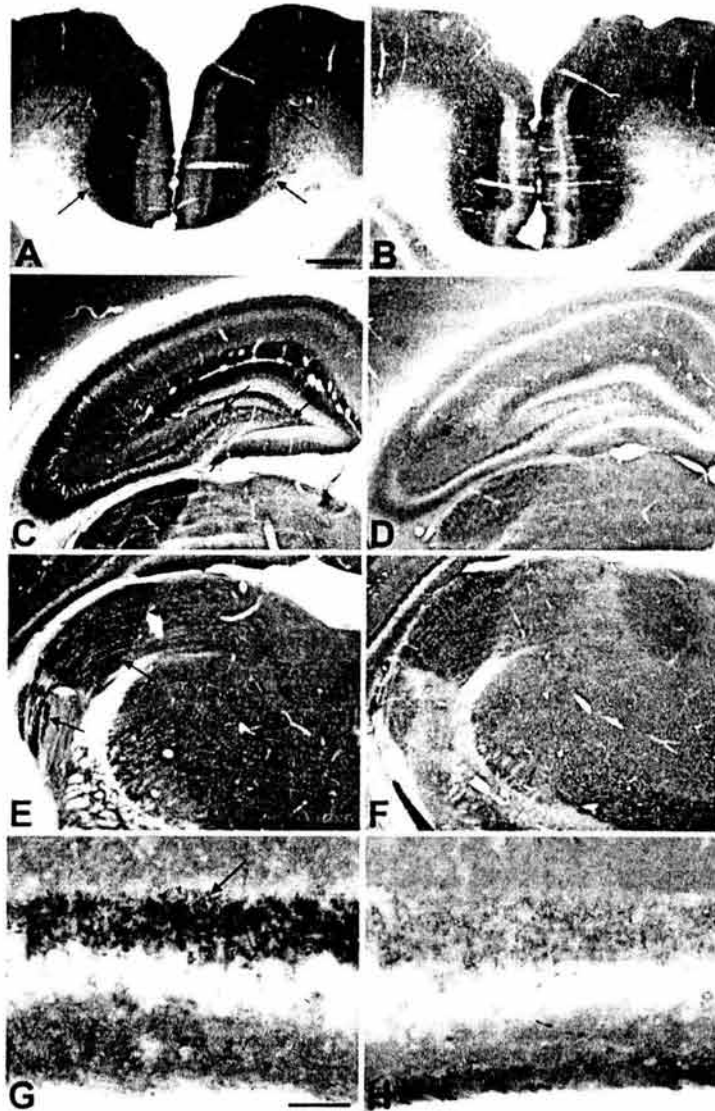


Fig. 4. Synapsin I immunohistochemistry. Photomicrographs of brain coronal sections (50 μ m) of 24-day-old rat pups treated with L-NAME from postnatal days 3–23 (A, C, E, and G) and controls (saline solution) (B, D, F, and H). Prefrontal cortex (A,B); hippocampus (C,D); dorsal thalamus (E,F); and magnification of hippocampal CA3 region (G,H). Arrows (†) indicate areas of intense staining. In all sections of the treated group, a diminution in synapsin I staining is observed. Scale bars in A–F = 350 μ m; G–H = 50 μ m.

no evident abnormalities were noticed in the treated pups as compared to controls during the daily observations. In line with this perception, there are other works using the same L-NAME inhibition protocol that report no alteration in behavior and motor activity in the treated rats [40]. However, other authors like Pickaerts et al. [76] report on an increase in the motor activity of rat pups tested in the open field as a result of L-NAME treatment.

Our results provide morphological evidence showing that the lack of NO induces a reduction in synaptic density and a synapsin deficiency. Thus, it can be hypothesized that synapsin depletion resulting from NO

absence may alter those brain functions that depend on the formation of synaptic connections, such as learning and memory.

Acknowledgments

Authors wish to thank Dr. Francisco Pellicer and Dr. Gabriela Rodríguez M. for helpful comments. They also thank M. Sánchez-Alvarez for correcting the English version. This work was partially supported by Grants CONACyT MLO 29151-N and UC-MEXUS-CONACYT.

References

- [1] D.S. Bredt, P.M. Hwang, C.E. Glatt, C. Lowenstein, R.R. Reed, S.H. Snyder, Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase, *Nature* 351 (1991) 714–718.
- [2] T.M. Dawson, V.L. Dawson, S.H. Snyder, A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide, *Ann. Neurol.* 32 (1992) 297–311.
- [3] S.H. Snyder, Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters?, *Science* 257 (1992) 494–496.
- [4] U. Forstermann, E.I. Closs, J.S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, H. Kleinert, Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions, *Hypertension* 23 (1994) 1121–1131.
- [5] O.W. Griffith, D.J. Stuehr, Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism, *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 707–736.
- [6] J. Garthwaite, C.L. Boulton, Nitric oxide signaling in the central nervous system, *Annu. Rev. Physiol.* 57 (1995) 683–706.
- [7] I. Hanbauer, D. Wink, Y. Osawa, G.M. Edelman, J.A. Gally, Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices, *Neuroreport* 3 (1992) 409–412.
- [8] X.Z. Zhu, L.G. Luo, Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices, *J. Neurochem.* 59 (1992) 932–935.
- [9] T.M. Dawson, S.H. Snyder, Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain, *J. Neurosci.* 14 (1994) 5147–5159.
- [10] M.K. Meffert, B.A. Premack, H. Schulman, Nitric oxide stimulates Ca(2+)-independent synaptic vesicle release, *Neuron* 12 (1994) 1235–1244.
- [11] P.R. Montague, C.D. Gancayco, M.J. Winn, R.B. Marchase, M.J. Friedlander, Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex, *Science* 263 (1994) 973–977.
- [12] J.P. Steiner, T.M. Dawson, M. Fotuhi, S.H. Snyder, Immunophilin regulation of neurotransmitter release, *Mol. Med.* 2 (1996) 325–333.
- [13] C. Holscher, Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity, *Trends Neurosci.* 20 (1997) 298–303.
- [14] J.A. Gally, P.R. Montague, G.N. Reeke Jr., G.M. Edelman, The NO hypothesis: possible effects of a short-lived rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 143–147.
- [15] D.T. Hess, S.I. Patterson, D.S. Smith, J.H. Skene, Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty cyclization by nitric oxide, *Nature* 366 (1993) 562–565.
- [16] F.M. Inglis, F. Furla, K.E. Zuckerman, S.M. Strittmatter, R.G. Kalb, The role of nitric oxide and NMDA receptors in the development of motor neuron dendrites, *J. Neurosci.* 18 (1998) 10493–10501.
- [17] G. Munch, J. Gasic-Milenkovic, S. Dukic-Stefanovic, B. Kuhla, K. Heinrich, P. Riederer, H.J. Huttunen, H. Founds, G. Sajithlal, Microglial activation induces cell death, inhibits neurite outgrowth and causes neurite retraction of differentiated neuroblastoma cells, *Exp. Brain Res.* 150 (2003) 1–8.
- [18] R.G. Kalb, J. Agostini, Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development, *Neuroscience* 57 (1993) 1–8.
- [19] N. Peunova, V. Scheinker, H. Cline, G. Enikolopov, Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain, *J. Neurosci.* 21 (2001) 8809–8818.
- [20] H.H. Wu, C.V. Williams, S.C. McLoon, Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development, *Science* 235 (1994) 1593–1596.
- [21] L.S. Chin, L. Li, A. Ferreira, K.S. Kosik, P. Greengard, Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 9230–9234.
- [22] H. Bravo, O. Inzunza, V. Fernandez, M. Sanhueza, Distribution of NADPH-d positive neurons during postnatal development of the rat somatosensory cortex correlates with gradients of neurogenesis and development, *Neurosci. Lett.* 234 (1997) 103–106.
- [23] F. Bouzioukh, F. Tell, G. Rougon, A. Jean, Dual effects of NMDA receptor activation on polysialylated neural cell adhesion molecule expression during brainstem postnatal development, *Eur. J. Neurosci.* 14 (2001) 1194–1202.
- [24] E. Sánchez-Islas, M. León-Olea, Histochemical and immunohistochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the olfactory epithelium of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*, *Nitric Oxide* 5 (2001) 302–316.
- [25] A. Ferreira, M. Rapoport, The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release, *Cell Mol. Life Sci.* 59 (2002) 589–595.
- [26] S.J. Oh, K.Y. Kim, E.J. Lee, S.J. Park, S.O. Kwon, C.S. Jung, M.Y. Lee, M.H. Chun, Inhibition of nitric oxide synthase induces increased production of growth-associated protein 43 in the developing retina of the postnatal rat, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 136 (2002) 179–183.
- [27] J. Chen, Z.G. Zhang, Y. Li, Y. Wang, L. Wang, H. Jiang, C. Zhang, M. Lu, M. Katakowski, C.S. Feldkamp, M. Chopp, Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke, *Ann. Neurol.* 53 (2003) 743–751.
- [28] A. Cheng, S. Wang, J. Cai, M.S. Rao, M.P. Mattson, Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain, *Dev. Biol.* 258 (2003) 319–333.
- [29] M. Leimert, D. Blotner, Neuronal nitric oxide synthase (bNOS) messenger RNA and protein expression in developing rat brainstem nuclei, *Neurosci. Lett.* 342 (2003) 57–60.
- [30] L. Li, L.S. Chin, O. Shupliakov, L. Brodin, T.S. Sihra, O. Hvalby, et al., Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 9235–9239.
- [31] M.K. Meffert, N.C. Calakos, R.H. Scheller, H. Schulman, Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions, *Neuron* 16 (1996) 1229–1236.
- [32] M.P. Mattson, A.J. Bruce-Keller, Compartmentalization of signaling in neurons: evolution and deployment, *J. Neurosci. Res.* 58 (1999) 2–9.
- [33] A. Mizoguchi, Role of vesicle fusion mechanism and cell adhesion molecules in growth cone elongation and synaptogenesis, *Kaibogaku Zasshi.* 74 (1999) 473–483.
- [34] N.E. Ziv, Recruitment of synaptic molecules during synaptogenesis, *Neuroscientist* 7 (2001) 365–370.
- [35] V. Chevaleyre, F.C. Moos, M.G. Desarmenien, Interplay between presynaptic and postsynaptic activities is required for dendritic plasticity and synaptogenesis in the supraoptic nucleus, *J. Neurosci.* 22 (2002) 265–273.
- [36] S. Cohen-Cory, The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits, *Science* 298 (2002) 770–776.
- [37] P.L. Huang, T.M. Dawson, D.S. Bredt, S.H. Snyder, M.C. Fishman, Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene, *Cell* 75 (1993) 1273–1286.
- [38] R.J. Nelson, D.E. Demas, P.L. Huang, M.C. Fishman, W.L. Dawson, T.M. Dawson, et al., Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase, *Nature* 378 (1995) 383–386.
- [39] J.L. Dinerman, T.M. Dawson, M.J. Schell, A. Snowman, S.H. Snyder, Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 4214–4218.

- [40] M. Virgili, B. Monti, A. LoRusso, M. Bentivogli, A. Contestabile, Developmental effects of in vivo and in vitro inhibition of nitric oxide synthase in neurons, *Brain Res.* 839 (1999) 164–172.
- [41] C.V. Williams, D. Nordquist, S.C. McLoon, Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system, *J. Neurosci.* 14 (3 Pt. 2) (1994) 1746–1755.
- [42] K.S. Cramer, A. Angelucci, J.O. Hahm, M.B. Bogdanov, M. Sur, A role for nitric oxide in the development of the ferret retinogeniculate projection, *J. Neurosci.* 16 (1996) 7995–8004.
- [43] R.R. Mize, H.H. Wu, R.J. Cork, C.A. Scheiner, The role of nitric oxide in development of the patch-cluster system and retinocollicular pathways in the rodent superior colliculus, *Prog. Brain Res.* 118 (1998) 133–152.
- [44] A. Vercelli, D. Garbossa, S. Biasiol, M. Repici, S. Jhaveri, NOS inhibition during postnatal development leads to increased ipsilateral retinocollicular and retinogeniculate projections in rats, *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 473–490.
- [45] A. Vercelli, D. Garbossa, M. Repici, S. Biasiol, S. Jhaveri, Role of nitric oxide in the development of retinal projections, *Ital. J. Anat. Embryol.* 106 (2 Suppl. 1) (2001) 489–498.
- [46] J. Myslivecek, J. Hassmannova, J. Barcal, J. Safanda, V. Zalud, Inhibitory learning and memory in newborn rats influenced by nitric oxide, *Neuroscience* 71 (1996) 299–312.
- [47] D.S. Bredt, Targeting nitric oxide to its targets, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211 (1996) 41–48.
- [48] J.E. Brenman, D.S. Chao, S.H. Gee, A.W. McGee, S.E. Craven, D.R. Santillano, Z. Wu, F. Huang, H. Xia, M.F. Peters, S.C. Froehner, D.S. Bredt, Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha-1-syntrophin mediated by PDZ domains, *Cell* 84 (1996) 757–767.
- [49] H.C. Kornau, L.T. Schenker, M.B. Kennedy, P.H. Seeburg, Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95, *Science* 269 (1995) 1737–1740.
- [50] R. Sattler, Z. Xiong, W.Y. Lu, M. Hafner, J.F. MacDonald, M. Tymianski, Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein, *Science* 284 (1999) 1845–1848.
- [51] S.R. Jaffrey, F. Benfenati, A.M. Snowman, A.J. Czernik, S.H. Snyder, Neuronal nitric oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 3199–3204.
- [52] M. Fang, S.R. Jaffrey, A. Sawa, K. Ye, X. Luo, S.H. Snyder, Dexas1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON, *Neuron* 28 (2000) 183–193.
- [53] O. Sporns, S. Jenkinson, Potassium- and nitric oxide-induced exocytosis from populations of hippocampal synapses during synaptic maturation in vitro, *Neuroscience* 80 (2000) 1057–1073.
- [54] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Sydney, 1998.
- [55] S.R. Vincent, H. Kimura, Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain, *Neuroscience* 46 (1992) 755–758.
- [56] R.H. Melloni Jr., L.J. DeGennaro, Temporal onset of synapsin I gene expression coincides with neuronal differentiation during the development of the nervous system, *J. Comp. Neurol.* 342 (1994) 449–462.
- [57] S. Suemaru, K. Sato, K. Morimoto, N. Yamada, T. Sato, S. Kuroda, Increment of synapsin I immunoreactivity in the hippocampus of the rat kindling model of epilepsy, *NeuroReport* 11 (2000) 1319–1322.
- [58] T. Ueda, C.A. Stratford, J. Larson, Distribution of protein I, a synapse-specific phosphoprotein, and adenylate cyclase in the rat spinal cord, *J. Neurochem.* 36 (1981) 293–296.
- [59] S.E. Goelz, E.J. Nestler, B. Chehrizi, P. Greengard, Distribution of protein I in mammalian brain as determined by a detergent-based radioimmunoassay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2130–2134.
- [60] M.D. Browning, C.K. Huang, P. Greengard, Similarities between protein IIIa and protein IIIb, two prominent synaptic vesicle-associated phosphoproteins, *J. Neurosci.* 7 (1987) 847–853.
- [61] P. De Camilli, R. Cameron, P. Greengard, Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections, *J. Cell Biol.* 96 (1983) 1337–1354.
- [62] P. De Camilli, M. Vitadello, M.P. Canevini, R. Zanoni, R. Jahn, A. Gorio, The synaptic vesicle proteins synapsin I and synaptophysin (protein P38) are concentrated both in efferent and afferent nerve endings of the skeletal muscle, *J. Neurosci.* 8 (1988) 1625–1631.
- [63] P. De Camilli, F. Benfenati, F. Valtorta, P. Greengard, The synapsins, *Annu. Rev. Cell Biol.* 6 (1990) 433–460.
- [64] T.E. Finger, M. Womble, J.C. Kinnamon, T. Ueda, Synapsin I-like immunoreactivity in nerve fibers associated with lingual taste buds of the rat, *J. Comp. Neurol.* 292 (1990) 283–290.
- [65] P. Greengard, F. Valtorta, A.J. Czernik, F. Benfenati, Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function, *Science* 259 (1993) 780–785.
- [66] S.M. Lohmann, T. Ueda, P. Greengard, Ontogeny of synaptic phosphoproteins in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4037–4041.
- [67] L.J. DeGennaro, S.D. Kanazir, W.C. Wallace, R.M. Lewis, P. Greengard, Neuron-specific phosphoproteins as models for neuronal gene expression, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 48 (Pt. 1) (1983) 337–345.
- [68] C.A. Mason, Axon development in mouse cerebellum: embryonic axon forms and expression of synapsin I, *Neuroscience* 19 (1986) 1319–1333.
- [69] R.Y. Moore, M.E. Bernstein, Synaptogenesis in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by electron microscopy and synapsin I immunoreactivity, *J. Neurosci.* 9 (1989) 2151–2162.
- [70] A. Ferreira, H.T. Kao, J. Feng, M. Rapoport, P. Greengard, Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation, *J. Neurosci.* 20 (2000) 3736–3744.
- [71] B. Lu, P. Greengard, M.M. Poo, Exogenous synapsin I promotes functional maturation of developing neuromuscular synapses, *Neuron* 8 (1992) 521–529.
- [72] E. Schaeffer, J. Alder, P. Greengard, M.M. Poo, Synapsin IIa accelerates functional development of neuromuscular synapses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 3882–3886.
- [73] F. Valtorta, N. Iezzi, F. Benfenati, B. Lu, M.M. Poo, P. Greengard, Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis*, *Eur. J. Neurosci.* 7 (1995) 261–270.
- [74] H.J. Markowitsch, The anatomical bases of memory, In: M.S. Gazzaniga (Ed.), *The New Cognitive Neuroscience*, MIT Press, Cambridge, MA, pp. 785–795.
- [75] S. Moncada, R.M. Palmer, E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43 (1991) 109–142.
- [76] J. Prickaerts, J. De Vente, M. Markerink-Van Ittersum, H.W. Steinbusch, Behavioural, neurochemical and neuroanatomical effects of chronic postnatal *N*-nitro-L-arginine methyl ester treatment in neonatal and adult rats, *Neuroscience* 87 (1998) 181–195.