



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MOLSIDOMINE SOBRE
LA MODULACIÓN DEL SISTEMA NITRÉRGICO EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE DETERIORO COGNITIVO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. María de la Paz Alejandra Hernández Melesio

DIRECTORA DE TESIS: DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO

COMITÉ TUTORAL: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **HERNÁNDEZ MELESIO MARÍA DE LA PAZ ALEJANDRA** con número de cuenta **93538741** con la tesis titulada: **"EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL MOLSIDOMINE SOBRE LA MODULACIÓN DEL SISTEMA NITRÉRGICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DETERIORO COGNITIVO"** realizada bajo la dirección de : **DRA. FRANCISCA PÉREZ SEVERIANO**

Presidente: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ
Vocal: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
Secretario: DR. MIGUEL ANGEL JORGE GUEVARA FONSECA
Suplente: DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO
Suplente: DRA. GINA LORENA QUIRARTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de septiembre de 2011

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, bajo la dirección de la Dra. Francisca Pérez Severiano.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Medicina (UNAM) por su apoyo para llevar a cabo mis estudios de doctorado y la conclusión de este trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca, que hizo posible mi dedicación al desarrollo de este proyecto de investigación (beca no. 165271).

Mi más sincero agradecimiento y reconocimiento a la Dra. Francisca Pérez Severiano por su dirección, asesoría e inestimable apoyo.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias y la Dra. Lourdes Massieu Trigo por su orientación y por sus valiosas observaciones.

A los miembros del jurado:

Dra. Rosalinda Guevara Guzmán

Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca

Dra. Gina Lorena Quirarte

por sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron esta tesis.

Un especial agradecimiento a todas las personas que contribuyeron para hacer posible la realización de este proyecto de investigación.

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”

Al Dr. Camilo Ríos Castañeda, Jefe del laboratorio de Neuroquímica por permitirme desarrollar el proyecto en su laboratorio, así como por su valiosa asesoría.

A la M. en C. Yessica Heras Romero, por proporcionarme los animales requeridos para cada uno de los ensayos, además de su apreciable amistad y confianza.

Al aux. de bioterio Sr. Rafael Camacho Cervantes, por su amabilidad y esmero para mantener a los animales en óptimas condiciones en todo momento. ¡Gracias don Rafa por su apoyo!.

A la Dra. Alma Ortiz Plata y a la Biól. Aurora Sánchez García, por su apoyo técnico.

A la Dra. Dinora González Esquivel, por sus observaciones y asesoría.

A la Dra. Penélope Aguilera Hernández, Dra. Yesenia Rivera Mancía, al Dr. Juan Carlos Martínez Lazcano y al M. en C. Jorge Baruch Pineda Farías por su valiosa asesoría.

A la Psic. Mireya Chávez, por invitarme a participar en el grupo de apoyo para demencia; especialmente por permitirme compartir las experiencias de los pacientes y sus cuidadores.

Al M.V.Z. Rodolfo Pérez Madrigal, por proveer los animales de manera oportuna.

A la Lic. en Nut. Araceli Trejo, a la SE. Martha Legorreta y a la Sritas. secretarias Patricia Flores Torres y Verónica Romero Ruíz, por su amable atención durante mi estancia en el Instituto.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.

A la Dra. Lucía Quevedo Corona y al Dr. Sergio Zamudio, por su asesoría y las facilidades prestadas para la realización de la prueba de reconocimiento de objetos y el registro fílmico de los animales durante la prueba cognitiva.

A la Dra. Claudia Alva, por facilitar el equipo de filmación.

Al Dr. Jorge Pacheco Rosado, por facilitar las instalaciones para el resguardo adecuado de las ratas.

A la Q.F.I. Gema Escamilla Encinas y al aux. de bioterio Sr. Ricardo Salinas Luna, por su apoyo técnico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.

FACULTAD DE MEDICINA. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA.

A la Dra. María Esther Jiménez Cataño y a la Dra. Martha Eugenia Santoyo Pérez por las facilidades otorgadas para la realización del análisis inmunohistoquímico.

A la Dra. Claudia Castillo Martín del Campo, por el hospedaje durante parte de mi estancia.

A la Quím. Daniela de Jesús Cruz y a la M. en C. Rosalva Ríos Villa, por su valioso apoyo técnico.

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”.

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

A la Dra. Alicia Sánchez Mendoza, por sus valiosas sugerencias y por la revisión del artículo publicado.

Al Quím. Leonardo del Valle, por su asesoría y las facilidades otorgadas para realizar el análisis de nitritos.

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA.

DEPARTAMENTO DE NEUROMORFOMETRÍA.

A la Dra. Leticia Granados Rojas por su amable disposición para llevar a cabo la identificación del sitio de lesión en su laboratorio.

CINVESTAV - ZACATENCO

A la Q.F.I. Paula Vergara Zubillaga, por su valioso apoyo técnico para realizar el análisis densitométrico.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

A Blanca Huerta, Azucena Ayala Pichardo y Alejandra Cervantes, por su amistad y por las facilidades prestadas para la presentación de los exámenes.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

A la Lic. Erika Rodríguez Reyes, por su amistad, confianza y su invaluable apoyo y paciencia para la realización de los trámites del posgrado.

A Lilia Espinoza, al Dr. Armando Rodríguez Reyes, a la Lic. Ma. de Jesús Márquez y a la Lic. Patricia Oliva Estrella por la atención recibida.

A Lilia Jiménez, por su gran optimismo y sus palabras de ánimo, así como por facilitar los trámites para la obtención de la beca.

A la familia Tristán López, en especial a la Sra. Ma. Antonia López y a Luis Tristán por su confianza y su amabilidad al haberme brindado hospedaje durante mi estancia en San Luis Potosí.

Finalmente quiero agradecer profundamente a cada uno de los animales que fueron sacrificados para la realización de los experimentos que hicieron posible este trabajo, sabiendo que su sacrificio no fue en vano al contribuir con el desarrollo de la investigación biomédica.

DEDICATORIAS

A mis padres Paz Melesio González y Marcos Hernández Cázares, por su apoyo y por estar siempre a mi lado... por ese espíritu inquebrantable y su alegría de vivir.

A POO, por ser parte importante de este proyecto, por tu cariño y comprensión en todo momento.

A Ivonne Villanueva, por tu optimismo, apoyo incondicional y por todo lo que hemos compartido.

A Lidia Tirado, por estos 12 años de amistad y por ese don natural que tienes para dar ánimos.

A Gonzala Cortés, por tu amistad y porque pese a la distancia, siempre estás presente.

A Erika Segura, por tu confianza y apoyo, por ser una amiga con la que siempre se puede contar.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Neuroquímica, con los que he podido compartir muchos momentos de diversión, risas y... trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo lo que me ha brindado y enseñado.

***La memoria es el único paraíso
del que no podemos ser expulsados.***

Johann Paul Friedrich Richter

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	5
1.1 Neuroanatomía y neuroquímica del cerebro basal anterior (CBA)	7
1.2 Participación del CBA en la cognición	8
1.3 Saporina IgG 192 (SAP): un modelo de deterioro cognitivo por hipofunción colinérgica	10
1.4 Mecanismo de selectividad y neurotoxicidad de la SAP	11
1.5 Regulación de la ACh en los procesos cognitivos	13
1.6 Óxido nítrico (NO): síntesis y metabolismo	14
1.7 Donadores de NO	19
1.8 Molsidomine (MOLS)	21
1.9 Participación del NO en la cognición	22
1.10 Señalización por NO: sobrevivencia neuronal	23
1.11 Relación entre los sistemas colinérgico y nitrérgico	24
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
3. RELEVANCIA E IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS	29
6.1 Animales	29
6.2 Generación del modelo experimental de daño colinérgico con SAP	29
6.3 Tratamiento con MOLS	31
6.4 Diseño experimental	31

6.5 Valoración de la actividad locomotriz	32
6.6 Prueba cognitiva	33
6.7 Evaluación del sistema colinérgico medio septal posterior a la administración de SAP y MOLS	34
6.7.1 Técnicas histológicas	34
6.7.2 Evaluación morfológica de las células septales mediante la técnica histológica de Nissl	35
6.7.3 Inmunodetección de la colina acetil transferasa (ChAT)	35
6.8 Evaluación del sistema nitrérgico en diferentes regiones cerebrales posterior a la administración de SAP y MOLS	37
6.8.1 Actividad de la sintasa del NO (NOS)	37
6.8.2 Análisis de la expresión de las isoformas de la NOS constitutiva (nNOS y eNOS)	38
6.8.3 Evaluación de los metabolitos del NO: NO ₂ -	39
6.9 Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Efecto del molsidomine sobre las alteraciones motoras asociadas a la administración de la SAP IgG-192 en ratas	41
7.2 Evaluación del efecto del molsidomine en el rescate del déficit cognitivo de los animales expuestos a la SAP IgG-192	43
7.3 Evaluación histológica del efecto del molsidomine sobre el daño neuronal y la neurodegeneración inducidos por la SAP IgG-192	45
7.4 Efecto del molsidomine sobre los cambios de la población colinérgica septal inducidos por SAP IgG-192	49
7.5 Participación del molsidomine en la modulación del sistema nitrérgico	51

7.5.1 Análisis de la actividad de la cNOS	51
7.5.2 Análisis de la expresión de la nNOS y eNOS	55
7.5.3 Evaluación de metabolitos del NO: NO ₂ ⁻	57
8. DISCUSIÓN	59
8.1 Efecto del donador de NO MOLS sobre la recuperación cognitiva en el modelo experimental de denervación colinérgica inducido por SAP	59
8.1.1 Facilitación del aprendizaje	59
8.2 Efecto del NO en la recuperación del daño celular del <i>septum</i> medial inducido por SAP	61
8.2.1 Posibles mecanismos neuroprotectores del MOLS en el sitio de lesión (SM)	61
8.3 Análisis inmunohistoquímico de ChAT	63
8.4 Evaluación del sistema nitrérgico en diferentes regiones cerebrales	64
8.4.1 Recuperación de la actividad de cNOS	64
8.4.2 Efecto del MOLS en la expresión de eNOS y nNOS	67
8.4.3 Evaluación de metabolitos del NO: NO ₂ ⁻	69
9. RESUMEN DE LOS RESULTADOS	70
10. PROPUESTA DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE MOLS	71
11. CONCLUSIÓN	72
12. BIBLIOGRAFÍA	73
13. APÉNDICES	90

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Esterasa de acetilcolina
AChM-R	Receptores muscarínicos
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
ARN	Ácido ribonucleico
BDB	Banda diagonal de Broca
BO	Bulbos olfatorios
CaM	Calmodulina
CaMKII	Proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CBA	Cerebro basal anterior
ChAT	Enzima transferasa de acetilcolina
cNOS	Sintasa del óxido nítrico constitutiva
CORT	Corticosterona
CX	Corteza prefrontal
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
ESC	Escopolamina
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMN	Flavina mononucleótido
GABA	Ácido γ aminobutírico
GC	Enzima guanilato ciclasa
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HC	Hipocampo
iNOS	Sintasa del óxido nítrico inducible
MOLS	Molsidomine
NBM	Núcleo basal de Meynert
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Sintasa del óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico

NO²⁻	Nitritos
NOS	Enzima sintasa del óxido nítrico
NT	Neurotransmisores
NTF	Neurotrofinas
p75-R	Receptor p75
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PI₃K	Cinasa 3' de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
PRO	Prueba de reconocimiento de objetos
pro-NGF	Precursor del factor de crecimiento neuronal
SAP	Inmunotoxina saporina IgG-192
SM	<i>Septum</i> medial
SSI	Solución salina isotónica
ST	Cuerpo estriado
TrkA-R	Receptor de alta afinidad para el factor de crecimiento neuronal (receptor de cinasa tipo A de tirosina)
VSH	Vía septohipocampal
Zn	Zinc

RESUMEN

La demencia es un proceso complejo que involucra diversos trastornos que conducen al detrimento de la función cerebral, lo que se manifiesta como pérdida de la memoria de corto y largo plazo. Otros síntomas asociados a los procesos demenciales son las alteraciones del razonamiento, el juicio, la incapacidad para realizar tareas cotidianas; así como cambios en la personalidad y el comportamiento. Aún cuando se sigue considerando a la edad como el principal factor de desarrollo de la demencia, existen eventos bioquímicos que predisponen su aparición, como la disminución de los neurotransmisores óxido nítrico (NO) y acetilcolina (ACh). Aunado a lo anterior, la degeneración de los circuitos neocorticales y septohipocampales, derivada de la pérdida de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (CBA), son eventos correlacionados con las alteraciones cognitivas, conductuales y funcionales de la demencia.

Uno de los modelos experimentales desarrollados para generar hipofuncionalidad por la disminución de marcadores colinérgicos, como ocurre en la demencia de Alzheimer, es el uso de la inmunotoxina saporina IgG 192 (SAP). La administración intracerebroventricular de la SAP en ratas, ocasiona la muerte selectiva de las neuronas colinérgicas del CBA y la disminución de la actividad de la enzima transferasa de acetil colina (ChAT), tanto en la corteza como en el hipocampo, lo que se relaciona con un déficit del desempeño de animales inyectados con la SAP en diferentes pruebas cognitivas. Al igual que la ACh, el NO juega un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria. Está demostrado que la inhibición de la sintasa del óxido nítrico (NOS) bloquea la cognición, mientras que la administración exógena de NO a través de donadores como el molsidomine (MOLS) la favorece. Debido a la relación que existe entre los sistemas colinérgico y nitrérgico, se propone el uso del MOLS como una herramienta farmacológica capaz de antagonizar el déficit cognitivo producido por la administración del antagonista

muscarínico y amnésico escopolamina, sin embargo, hasta la fecha no está descrito el efecto del NO sobre el rescate de la funcionalidad colinérgica en el modelo causado por la SAP.

La presente tesis es la primera investigación en demostrar el efecto modulador del NO sobre el sistema nitrérgico cortical y estriatal en este modelo, través de la administración del donador MOLS. Se propone que este efecto modulador se relaciona con la facilitación del aprendizaje y con la recuperación de la memoria de reconocimiento durante la fase de elección de la prueba de reconocimiento de objetos. Estos resultados sugieren la utilidad del MOLS como un candidato para el desarrollo de un tratamiento farmacológico para el déficit cognitivo moderado y los síntomas cognitivos tempranos en los procesos demenciales como la enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

Dementia is a multifactorial process defined as the brain hypofunctionality that induces the loss of short and long term memories. Other symptoms related to demential processes are reasoning and judgment disturbances as well as the disability for daily activities. These events are accompanied by personality and behavioral changes. Despite that aging is the main factor for the setting of dementia, some other biochemical disturbances like reduction of acetylcholine and nitric oxide levels, as well as the deficit in the cholinergic transmission from the basal forebrain to the neocortex and hippocampus, are thought to contribute to the development of cognitive symptoms of Alzheimer's dementia.

Intraventricular or intraseptal administration of the immunotoxin 192 IgG saporin (SAP) in rats is related to cholinergic transmission disturbances and also to biochemical and physiological changes *in situ*. The cholinergic denervation induced by SAP produces depletion of cholinergic markers like choline acetyltransferase (ChAT) in the cortical and hippocampal presynaptic terminals, as well as marked failure in several cognitive tasks.

Nitric oxide (NO) is an important neuromodulator that plays a major role in learning and memory processes. The participation of NO in cognition has been demonstrated through the use of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors, while NO donors like molsidomine (MOLS) recover the cognitive function.

Although the relationship between NO and cholinergic system has been evidenced through the use of MOLS as a pharmacological tool used to antagonize the cognitive deficit associated to cholinergic hypofunction, produced by the scopolamine model, the participation of NO in the recovery of the cholinergic function in the SAP model has not been analyzed yet.

This PhD thesis is the first investigation demonstrating the modulatory effect of MOLS on the cortical and striatal nitrenergic system in the SAP's model, which could be promoting the learning process as well the recovery of the recognition memory in the choice phase of the

object recognition task. The dual ability of MOLS to counteract SAP-induced cognitive and nitrenergic effects, allows us to suggest MOLS as a good candidate for its development as pharmacological tool for the treatment of cognitive deficit associated with Alzheimer's disease and in the mild cognitive impairment.

1. ANTECEDENTES

La demencia es el resultado de la disminución progresiva de las funciones cognitivas, cuyos síntomas principales son la pérdida gradual de la memoria y el aprendizaje, donde la edad es considerada como el factor principal de riesgo. Sin embargo, también existen eventos bioquímicos que predisponen su aparición como son la disminución en la síntesis y liberación de neurotransmisores (NT), entre ellos la acetilcolina (ACh) y el óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés *nitric oxide*) (Sánchez-Ayéndes y cols., 2003). A pesar de que en México no existe información actualizada sobre el número de adultos mayores con demencia, se estima que para el año 2050 el número de ancianos con déficit cognitivo será aproximadamente de 32.4 millones (Áviles-Funes y cols., 2006).

Durante el proceso de envejecimiento, se generan cambios estructurales y bioquímicos que afectan la plasticidad sináptica. Algunas de las alteraciones morfológicas que ocurren durante dicho proceso se refieren a la disminución de la ramificación dendrítica y de la densidad de espinas, así como a la reducción de la tasa de neurogénesis en el hipocampo (HC), lo cual se relaciona con deterioro cognitivo en seres humanos y en modelos experimentales (von Bohlen, 2010). El HC es una estructura de gran importancia que participa directamente en la formación de la memoria a largo plazo a partir de la información recientemente adquirida, a través de la integración y procesamiento de la información espacial y contextual (Driscoll y cols., 2003; Kenney y Gould, 2008).

La relación que existe entre las alteraciones funcionales hipocampales y la cognición, está demostrada en roedores a través de la aplicación de diferentes pruebas cognitivas, tal como el laberinto acuático de Morris, paradigma que evalúa la memoria de procedimiento y de referencia espacial. Los animales aprenden la localización de una plataforma por la asociación que existe entre ésta y señales colocadas en sitios estratégicos afuera del laberinto (Hodges, 1996). Empleando este paradigma, el grupo de Jeltsch y cols. (2001) demostró que ratas lesionadas mediante la inyección bilateral de colchicina en el giro

dentado, no son capaces de aprender la ubicación de dicha plataforma o de seguir las pistas. De igual manera se demostró que lesiones en ambos lóbulos temporales mediales en seres humanos, monos y ratas, también alteran el desempeño en pruebas de memoria de reconocimiento de objetos (Eichenbaum, 2004; Squire, 2004). Otra prueba cognitiva que evidencia la relación entre las alteraciones funcionales hipocampales y la cognición, es la prueba de reconocimiento de objetos (*PRO*), la cual se basa en la tendencia natural que presentan los roedores por la exploración de objetos novedosos y la discriminación de éstos ante objetos familiares o conocidos y es de gran utilidad para evaluar la memoria declarativa de eventos (episódica) (Winters y cols., 2008; Ennaceur y cols., 2005). Aquellos animales cuyo lóbulo temporal medial se encuentra intacto dedican un tiempo mayor a la exploración del objeto nuevo. Sin embargo, cuando esta prueba se aplica en ratas con lesiones hipocampales ocasionadas por la administración de ácido iboténico, éstas disminuyen la exploración del objeto novedoso en comparación con los controles (Ainge y cols., 2006).

Está documentado que trastornos en el sistema colinérgico, que conllevan a la disminución en la producción de ACh cerebral, también contribuyen en gran medida al deterioro cognitivo, tal y como sucede en la enfermedad de Alzheimer (Wevers, 2010; Fitz y cols., 2006; Scattoni y cols., 2006; Chang y Gold, 2004; Pappas y cols., 2005; Sánchez-Ayénde y cols., 2003; Leanza y cols., 1996). Un evento adicional que se asocia a la alteración cognitiva durante el envejecimiento, es la producción reducida del NO por disminución de la actividad de la sintasa del NO (NOS), lo que está evidenciado por la reducción de los niveles de la L-arginina en el cerebro de ratas Wistar viejas (Law y cols., 2002; Siles y cols., 2002).

1.1 NEUROANATOMÍA Y NEUROQUÍMICA DEL CEREBRO BASAL ANTERIOR

El *septum* medial (SM) forma parte del cerebro basal anterior (CBA), que es el principal sistema de neuromodulación colinérgica del cerebro (Deiana y cols., 2011; Fitz y cols., 2006; Harrell y cols., 2001). Diversos estudios anatómicos y neuroquímicos coinciden en señalar que es una región caracterizada por su heterogeneidad neuronal, así como su diversidad en cuanto a sus proyecciones tanto colinérgicas como GABAérgicas y glutamatérgicas se refiere, no obstante lo anterior, el CBA es considerado como una región colinérgica fundamentalmente (Wevers, 2010; McKinney y Jacksonville, 2005; Mesulam, 2004). Desde el punto de vista estructural, las células colinérgicas se definen por ser neuronas multipolares de gran tamaño (18-43 μm) con somas fusiformes u ovalados y con axones largos y árboles dendríticos extensamente ramificados (Woolf, 2006; Semba, 2000; D tari y cols., 1999).

El CBA es una región localizada en la base del cerebro, en posición anterior al hipotálamo y ventral a los ganglios basales. A nivel frontal limita con el tubérculo olfatorio y el núcleo *acumbens*, mientras que lateralmente lo hace con el complejo amigdaloides y la corteza piriforme. El CBA está constituido por tres grandes áreas: el área septal localizada en la zona más rostral y constituida por el *septum* medial (SM) y el limbo vertical de la banda diagonal de Broca. La zona más caudal del CBA corresponde a la región del núcleo basal magnocelular (NBM: núcleo basal de Meynert en roedores) que incluye también al globo pálido ventral y la sustancia innominata. La tercera de las áreas está formada por el limbo horizontal de la banda diagonal de Broca y el núcleo preóptico magnocelular (Montero-Pastor, 2004). La inervación del CBA, es similar en diferentes especies de mamíferos, incluyendo al hombre (Niewiadomska y cols., 2009). Se pueden identificar tres vías de inervación principales que son: el NBM, la banda diagonal de Broca (BDB) y el SM que en conjunto son los principales núcleos del CBA que inervan a la CX, la amígdala, a los bulbos olfatorios (BO), a la formación hipocampal y algunos núcleos talámicos (McKinney

y Jacksonville, 2005). Algunos autores reportan que lesiones generadas en estas regiones tienen repercusiones en diversos componentes del aprendizaje y la memoria (Wevers, 2010; Bassant y cols., 1998). En los núcleos colinérgicos del CBA del cerebro de los roedores se pueden encontrar al menos seis grupos de neuronas colinérgicas (CH1-CH6), los cuales se diferencian entre sí por el tipo de receptores muscarínicos (AChM-R) que expresan, así como a su respuesta al NGF y por las vías de señalización que activan (McKinney y Jacksonville, 2005). Los tipos celulares CH1 y CH2 se presentan principalmente en el SM y en el limbo vertical de la BDB, mientras que las neuronas CH3 están ubicadas en el limbo horizontal de esta misma región. Por su parte, las neuronas CH4 son características del NBM y los tipos celulares CH5 y CH6 se localizan en dos regiones del cerebro medio, el tegmento pedunculopontino y el laterodorsal, y proyectan principalmente a regiones corticales y talámicas respectivamente (McKinney y Jacksonville, 2005).

Con respecto a las vías de señalización asociadas a los subtipos de AChM-R, es importante recordar que M1, M3 y M5 se asocian a la hidrólisis de fosfoinosítidos con la consecuente activación de la proteína cinasa C (PKC) y la consecuente formación del 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃) y la movilización de Ca²⁺ intracelular. Por su parte, los subtipos M2 y M4 participan en la modulación de canales iónicos e inhiben a la adenilato ciclasa (Siegel y cols., 2006). Los AChM-R se localizan de manera diferencial y pueden co-existir en combinaciones de dos o más subtipos en las regiones blanco del CBA: amígdala y CX (M1, M3, M4); HC (M1, M3, M5); BO e hipotálamo (M2); estriado (M4); tálamo (M3; M5) y habénula (M5) (McKinney y Jacksonville, 2005).

1.2 PARTICIPACIÓN DEL CBA EN LA COGNICIÓN

Son abundantes las evidencias que demuestran la participación de las neuronas colinérgicas del CBA en la modulación de diferentes funciones cognitivas. La vía

colinérgica septohipocampal (VSH) (Figura 1), modula los procesos de adquisición y almacenamiento de la información espacial a través de la innervación colinérgica del hipocampo, la corteza frontal o ambos (Lamprea y cols., 2000; Janis y cols., 1998; Buhot y Naili, 1996; Shen y cols., 1996; Walsh y cols., 1996). La vía colinérgica que desemboca al hipocampo, constituye la principal vía involucrada en la consolidación de la memoria episódica y juega un papel muy importante en la detección de la novedad y las funciones asociativas que involucran estímulos motivacionales (Baxter y Chiba, 1999).



FIGURA 1. (A) Innervación de los principales núcleos colinérgicos en roedores. MS (septum medial): hipocampo, VDB/HDB (limbos vertical y horizontal de la banda diagonal de Broca): neocorteza y bulbo olfatorio respectivamente, NBM (núcleo basal de Meynert, SI: *substantia innominata*): amígdala y neocorteza. (B) Relación espacial de los núcleos colinérgicos del CBA. (Sato y Uchida, 2004).

La VHS tiene relevancia en la modulación de la respuesta al estrés, ya que ejerce un efecto inhibitor sobre el eje hipotálamo-pituitaria-adrenocortical, que es el sistema neuroendocrino que genera glucocorticoides en respuesta a una serie de estímulos estresantes, entre los que se incluyen eventos novedosos o amenazantes (Sawchenko, 2000). Esta vía también inhibe a las neuronas del núcleo paraventricular de manera indirecta a través de proyecciones GABAérgicas, disminuye la liberación de glucocorticoides (corticosterona; CORT) y facilita la capacidad de habituación en ratas (Herman y cols., 2002). De manera contraria, la generación de lesiones inmunotóxicas en

los núcleos colinérgicos del cerebro basal anterior incrementan la respuesta de CORT y reducen la capacidad de habituación de ratas expuestas a inmunotoxinas (Wellman, 2001; Joels y cols., 1997; Sapolsky y cols., 1986).

1.3 SAPORINA IgG 192: UN MODELO DE DETERIORO COGNITIVO POR HIPOFUNCION COLINÉRGICA

Debido a la necesidad de contar con un tipo de lesión cuya especificidad fuera útil para evaluar alteraciones exclusivas de la transmisión colinérgica, en las últimas décadas del siglo XX, se desarrolló un modelo experimental de deterioro cognitivo, a través del empleo de la inmunotoxina saporina IgG-192 (SAP), la cual genera hipofuncionalidad colinérgica.

La estructura de la SAP corresponde a un complejo formado por la saporina (30 kDa), que es una proteína perteneciente a la familia tipo 1 de lectinas inhibidoras de ribosomas (LIR) y que está unida a un anticuerpo de la clase IgG. La saporina proviene de las hojas, raíces y semillas de la *Saponaria officinalis*, la cual es una planta de tipo arbustivo perteneciente a la familia de las *Caryophyllaceae* y que se conoce comúnmente como saponaria o hierba jabonera (Barbieri y cols., 1993).

Las LIR tienen la propiedad de dañar la maquinaria ribosomal de manera irreversible, pues su sitio de acción se encuentra ubicado en una estructura “tallo-asa” altamente conservada y rica en purinas del ARN ribosomal (ARNr) 28S, que se conoce como *loop α-sarcina/ricina* (Stirpe, 2004). La unión N-glicosídica de la saporina y la remoción de adeninas específicas del ARNr, no permite la unión de los factores de elongación eEF-1 y eEF-2 a los ribosomas, inhibiendo de este modo la síntesis de proteínas e interrumpiendo el proceso de translocación (Bagga y cols., 2003; Barbieri y cols., 2000; Hudak y cols., 2000).

La toxicidad de la saporina, aunada al acoplamiento de un anticuerpo dirigido hacia un tipo de receptor en particular, son características que le confieren a la inmunotoxina SAP una gran especificidad celular.

1.4 MECANISMO DE SELECTIVIDAD Y NEUROTOXICIDAD DE LA SAP

Las neuronas colinérgicas del CBA, presentan características propias que las hacen susceptibles al efecto de la SAP y está demostrado que un porcentaje elevado de estas neuronas expresan receptores p75 para el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Montero-Pastor, 2004). La SAP es una inmunotoxina con alta especificidad para las neuronas colinérgicas del CBA, ya que el anticuerpo monoclonal acoplado a la proteína saporina, está dirigido al receptor p75 (p75-R). El p75-R es una proteína transmembranal que tiene una analogía estructural y funcional con el receptor para el factor de necrosis tumoral (TNF); en roedores su expresión está restringida principalmente a neuronas colinérgicas del CBA y en grupos neuronales de los núcleos caudado y putamen, neuronas motoras y células cerebelares de Purkinje (Roux y Barker, 2002; Leanza y cols., 1996). La función biológica del p75-R se deriva de su interacción con diversas proteínas, entre las que se destaca su relación sinérgica con el receptor de superficie para neurotrofinas TrkA (TrkA-R; receptor de cinasa tipo A de tirosina). La co-expresión de ambos receptores (p75-R y TrkA-R) en las neuronas colinérgicas del CBA promueve la sobrevivencia neuronal, mediante la activación del factor de transcripción NFκ-β (Kaplan y Miller, 2000), mientras que su unión con NRAGE (*neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog*) ocasiona la apoptosis de células del tipo MAH (Fin y cols., 1995). Otras proteínas que se relacionan funcionalmente con p75-R son NADE, TRAF, RIP 2, FAP-1, caveolina, entre otras (Roux y Barker, 2002).

Algunos de los eventos que generan neurotoxicidad en las neuronas colinérgicas de CBA son, la disminución de los receptores TrkA y la producción de neurotrofinas (NTF) (Epa y

cols., 2004). Las NTF se sintetizan a partir de moléculas precursoras que se denominan pro-neurotrofinas (pro-NGF) y que son las formas moleculares que tienen mayor afinidad por el p75-R. El procesamiento proteolítico de las pro-NGF por enzimas convertasas, genera la molécula madura dimérica que tiene mayor afinidad por el TrkA-R, dirigiendo la señalización a la supervivencia celular; mientras que un exceso de precursores de NTF promueve la apoptosis (Figura 2) (Cuello y cols., 2010). Está demostrado que la denervación colinérgica asociada a la inyección de la SAP en CBA en modelos experimentales, incrementa la proporción entre los precursores pro-NGF y el NGF maduro, además de la disminución de los receptores TrkA en el CBA (Webster y Pirrung, 2008). Gu y cols. (2000) demostraron que la denervación colinérgica del CBA, generada por el modelo de la SAP, se relaciona con la disminución en los niveles del NGF maduro y la regulación a la baja de la expresión del TrkA-R en el HC .

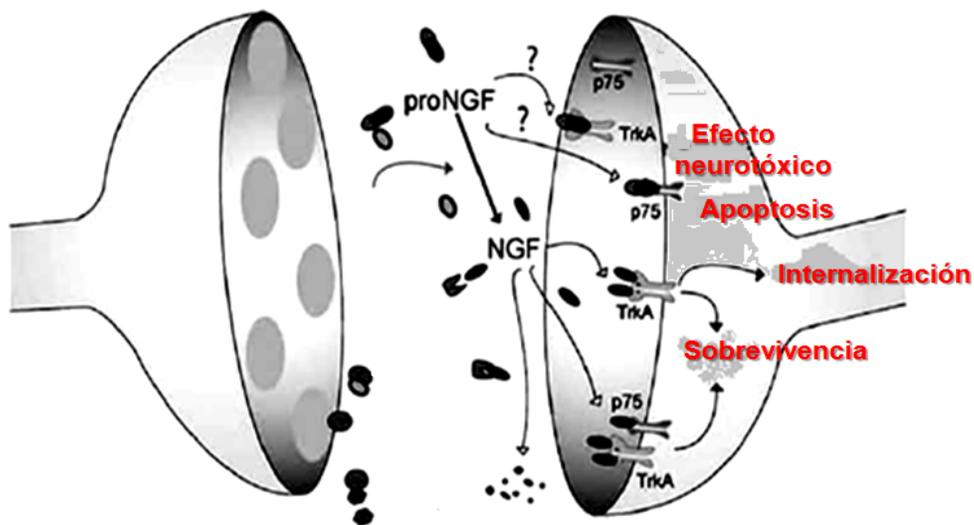


FIGURA 2. Mecanismos de muerte celular o supervivencia por activación de los receptores TrkA y/o p75 en las terminales sinápticas del CBA (Modificado de Cuello y cols., 2010).

Derivada de la muerte selectiva de las neuronas colinérgicas del CBA ocasionada por SAP, algunos autores reportan a través de estudios bioquímicos, histológicos e inmunohistoquímicos, la baja en los niveles y actividad de diversos marcadores colinérgicos en el SM y en las terminales corticales e hipocampales, lo que depende de la dosis administrada y del tiempo posterior a la lesión. Es así que, la administración de la SAP vía intracerebroventricular (i.c.v.) ó intraparenquimal tanto en ratas neonatas como adultas, disminuye la recaptura de colina así como el transporte vesicular de ACh en las terminales presinápticas. Aunado a lo anterior, también se reporta reducción del 90-95% de los niveles de la ChAT, así como la disminución de la esterasa de ACh (AChE). Estos cambios neuroquímicos, que en conjunto definen a la hipofuncionalidad colinérgica, son eventos que promueven un desempeño deficiente cuando se aplican diferentes pruebas cognitivas y también la alteración del comportamiento de los animales lesionados con SAP (Martin y cols., 2008; Quinlivan y cols., 2007; Pappas y Sherren, 2003; Ricceri y cols., 2002; Ferreira y cols., 2001; Harrell y cols., 2001; He y cols., 2001; Doyle y cols., 1996; Leanza y cols., 1996; Robner y cols., 1995; Waite y cols., 1994; Moncada y cols., 1991).

1.5 REGULACIÓN DE LA ACh EN LOS PROCESOS COGNITIVOS

Es importante mencionar que la ACh modula diferentes funciones cognitivas en el sistema nervioso central, entre ellas la memoria declarativa en humanos y su equivalente en roedores, la memoria episódica (Deiana y cols., 2011). También es conocido el papel de la ACh en la adquisición y retención de nueva información (Dere y cols., 2007; Von Linstow Roloff y cols., 2007; Ramírez-Lugo y cols., 2002). Por otra parte, el papel de la ACh en los procesos atencionales está demostrado en varios estudios experimentales tanto en humanos como en modelos animales, a través del manejo farmacológico por la administración de ácido iboténico, quinolínicó ó AMPA en el CBA de roedores; también

mediante el uso de lesiones electroquímicas e inmunotóxicas producidas por la administración de la SAP (Klinkenberg y cols., 2011). El proceso de atención puede ser definido como: la expresión cognitiva o conductual de un mecanismo neural que modula la eficacia de la adquisición de nueva información en situaciones caracterizadas por la presencia de múltiples y diversos estímulos, seleccionando aquella información que es relevante e ignorando, simultáneamente, la irrelevante (Sarter y cols., 2003; Wenk, 1997). La mayor parte de los trabajos experimentales de evaluación conductual están centrados en el estudio de la hipofunción colinérgica derivada de la administración de la escopolamina (ESC) y de otros antagonistas muscarínicos. Derivado de estos estudios se demostró que, el bloqueo de los receptores muscarínicos M1, M3 y M5 administrando pirenzepina, resulta en alteraciones atencionales y reduce la adquisición de la aversión condicionada al sabor en roedores (McQuail y Burk, 2006; Ramírez-Lugo y cols. 2003; Herremans y cols.,1996). Uno de los paradigmas utilizados para demostrar la participación del sistema colinérgico sobre la memoria de trabajo, es el condicionamiento operante a través del paradigma del DMTP (*delayed matching to position*). Para la correcta resolución de las pruebas de DMTP, los animales deben detectar y discriminar la aparición de estímulos que señalan la llegada de un refuerzo o bien, la ausencia de éste. Algunos autores demostraron que la administración cortical de ESC previo a la realización de la DMTP, ocasiona una disminución en el desempeño de la prueba por alteración en el proceso de aprendizaje (Newman y McGaughy, 2008; Von Linstow Roloff y cols., 2007).

1.6 ÓXIDO NÍTRICO: SÍNTESIS Y METABOLISMO

El óxido nítrico (NO) es un mensajero gaseoso que no se almacena en vesículas sinápticas como otros neurotransmisores, sino que se sintetiza de acuerdo a la disponibilidad de su precursor, L-arginina (Garthwaite y cols., 2002). El NO, no se puede liberar por exocitosis, ni se une a receptores de membrana en células adyacentes,

simplemente se difunde dentro de ellas (Hall y Garthwaite, 2009; Ledo y cols., 2004; Lowenstein y cols., 1994). La participación del NO en la señalización celular se relaciona con diversos eventos entre los que se destaca su participación en la actividad cardiovascular, así como en la activación del sistema inmune y como NT en el sistema nervioso. La secuencia final del metabolismo del NO es su oxidación a los productos finales: nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) (Zhou y Zhu, 2009). Aún cuando hay discrepancias debidas a la sensibilidad del método de cuantificación, la concentración basal del NO en los tejidos, especialmente en el cerebro, oscila en el rango aproximado de 10 nM (Hall y Garthwaite, 2009).

En cuanto a la síntesis del NO, ésta se lleva a cabo a través de la oxidación de la L-arginina a L-citrulina + NO (Figura 3). Esta reacción es catalizada por las sintasas del óxido nítrico (NOS), las cuales contienen un grupo hemo con una secuencia similar a la reductasa del citocromo P450. Existen 3 isoformas de la NOS como producto de diferentes genes, con diferente localización, regulación, propiedades catalíticas, sensibilidad a inhibidores y con una homología del 51-57% entre las isoformas humanas.

(a) NOS neuronal (nNOS, tipo I, o NOS-1). La expresión de esta isoforma es constitutiva y dependiente de Ca^{2+} y está regulada a través de la unión reversible de Ca^{2+} /calmodulina (CaM) (Bredt y Snyder, 1994). La nNOS se localiza principalmente en el citosol de neuronas de las siguientes regiones, corteza cerebral, núcleo endopiriforme ventral, claustró, bulbo olfatorio, núcleo olfatorio, núcleo *acumbens*, cuerpo estriado, amígdala, hipocampo (particularmente en la región CA1 y giro dentado), hipotálamo (núcleos supraóptico y paraventricular), tálamo, núcleos dorsal lateral y tegmental pedúnculo pontino, cuerpo trapezoide, rafé magno, núcleos del tracto solitario y el cerebelo. La nNOS constituye el principal recurso de NO en las neuronas; sin embargo, también se localiza en astrocitos, en la capa adventicia de vasos sanguíneos y miocitos

cardiacos de rata. Además está presente en el músculo esquelético, cardíaco y liso, en donde el NO generado regula el flujo sanguíneo y la contractibilidad muscular (Zhou y Zu, 2009; Kavia y cols., 2006; Knowles y Moncada, 1994).

(b) NOS inducible (iNOS, tipo II, o NOS-2). Esta isoforma se encuentra en el citosol de los astrocitos o células de la microglía y se induce ampliamente en varios tejidos en respuesta a eventos tales como inflamación, infecciones virales o accidentes vasculares (Luo y Ciskova, 2000). Como el opuesto a la regulación calcio-dependiente de la actividad NOS constitutiva (eNOS y nNOS), la iNOS es descrita como insensible al Ca^{2+} , probablemente debido a su estrecha interacción no covalente con la calmodulina (CaM) y Ca^{2+} (Kavia y cols., 2006; Alderton y cols, 2001).

(c) NOS endotelial (eNOS, tipo III, o NOS-3). La eNOS se identificó inicialmente en células endoteliales y estudios recientes demuestran la existencia de genes de la eNOS en neuronas, en donde su expresión es constitutiva. La eNOS se puede encontrar tanto en la membrana como en el citosol de las células endoteliales, que regulan el flujo sanguíneo cerebral de una población de neuronas piramidales de las subregiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo y de las células granulares del giro dentado (Kavia y cols., 2006; Alderton y cols, 2001).

Un aspecto de suma importancia es que la biosíntesis de NO es un proceso que está regulado por múltiples vías de señalización y también involucra la participación de otros sistemas de NT como lo es el del glutamato (GLU) (Ledo y cols., 2004).

La activación de los receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA-R) por GLU, desencadena un proceso de señalización que inicia con el influjo de Ca^{2+} al interior de la neurona, debido a que los NMDA-R están acoplados a un canal iónico dependiente de voltaje. El incremento del Ca^{2+} en el citosol propicia su unión con la CaM, evento que se traduce en la activación de la cNOS.

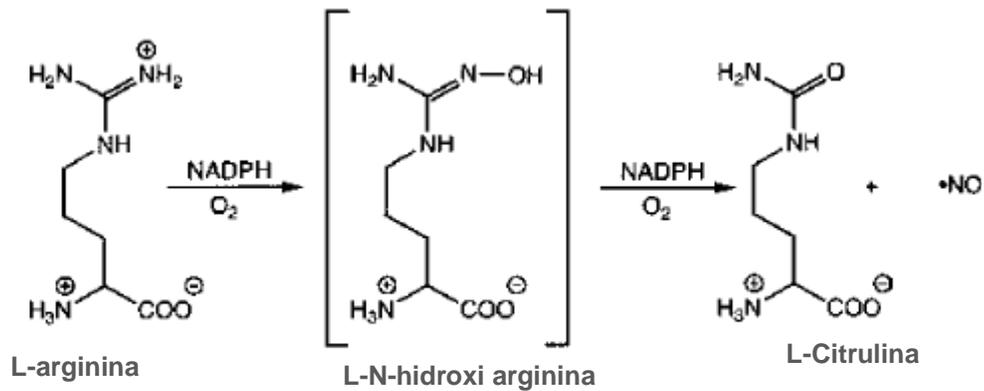


Figura 3. Síntesis del NO (Marletta y cols., 1998).

Las tres enzimas que participan en la síntesis del NO tienen una acción catalítica y son diméricas en su forma activa. Con respecto a este punto, en el dominio oxigenasa, ubicado en el extremo N-terminal de la enzima, se localiza un sitio de unión para Zn, el cual facilita la dimerización de la nNOS. Esto se lleva a cabo a través de la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína presentes en dos monómeros (Vincent, 2010).

Las NOS tienen como cofactores al complejo CaM, la tetrahidrobiopterina (BH₄), el FAD, el FMN, así como un grupo hierro protoporfirina IX (hemo). Las NOS catalizan la reacción entre la L-arginina, el oxígeno y la NADPH para la formación de NO, L-citrulina y NADP. Debido a que las NOS utilizan al NADPH para oxidar a la L-Arginina, se presume que cumplen con una función de oxidasa que se lleva a cabo en dos pasos. El NADPH funciona como donador de electrones y el oxígeno como aceptor. El primer paso de esta reacción consiste en la hidroxilación de uno de los átomos de nitrógeno del grupo guanidino de la L-arginina para dar lugar a la L-N- hidroxarginina (L-NH), compuesto intermediario que permanece unido a la enzima (Figura 3). Posteriormente se lleva a cabo la conversión de la L-NH a L-citrulina y NO (Bredt, 1999).

La síntesis y función del NO como NT se deriva de la regulación postraduccional de la NOS, siendo la fosforilación el principal mecanismo regulatorio de la isoforma nNOS. La fosforilación ocurre en residuos de treonina y serina, principalmente en el dominio de oxigenasa. Esta modificación está regulada por enzimas cinasas y fosfatasas como PKA, CaMKII, PKC y fosfatasa I. Otro mecanismo de regulación se asocia con el incremento de Ca^{2+} intracelular, ya que la nNOS es inactiva a concentraciones basales, mientras que el incremento de Ca^{2+} favorece la activación de la enzima por la unión de la CaM a la nNOS.

Un mecanismo más de regulación de la nNOS se refiere a su localización intracelular. La nNOS tiene además un dominio PDZ, que la ubica en las membranas sinápticas y que puede interactuar con otras proteínas que también contienen este dominio (Vincent, 2010; Alderton y cols., 2001).

Con respecto a la regulación de la actividad de la eNOS, se reporta que la fosforilación de la serina 1179 (Ser₁₁₇₉) se lleva a cabo por la proteína cinasa Akt, debido al incremento en el flujo de electrones a través de su dominio reductasa (ubicado en el extremo C terminal) y al incremento en la producción de NO. En contraste, la fosforilación de nNOS en Ser₈₄₇ por la cinasa dependiente de la calmodulina, induce un decremento en la actividad de esta enzima (Alderton y cols., 2001). Por su parte, la N-miristoilación y la S-palmitoilación de la eNOS, determinan la localización subcelular de ésta. La N-miristoilación, es un proceso a menudo irreversible que determina la unión de la enzima con la membrana endotelial y se lleva a cabo por la unión covalente del ácido graso saturado miristato, a un residuo de glicina localizado en el extremo N terminal de la eNOS. De manera subsecuente la palmitoilación de la eNOS también ocurre a través de la adición de un palmitato por la acción de enzimas palmitoiltransferasas. Está demostrado que la carencia de palmitoilación de la eNOS, provoca que la enzima permanezca unida y se acumule en el aparato de Golgi, por lo que se sugiere que este proceso es esencial

para el tráfico de la eNOS hacia la membrana plasmática y su interacción con ciertos componentes membranales como la caveolina-1 (Ortiz y Garvin, 2003).

Todas las isoformas clonadas de NOS poseen secuencias para fosforilación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) y proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /CaM (Bredt y Snyder, 1992). Es probable que la fosforilación disminuya la actividad catalítica de todas las isoformas de NOS (Dinerman y cols., 1994). La fosforilación podría interactuar con otros tipos de modulación de la enzima, por ejemplo, el NO estimula a la guanilato ciclasa (GC) para formar GMPc, que inhibe a la NOS vía PKG. La Ca^{2+} /CaM activa directamente a la enzima, pero la fosforilación vía Ca^{2+} /CaM la inhibe. De manera similar, el Ca^{2+} activa a la PKC, que a su vez inhibe a la NOS a través de la fosforilación (Ortiz y Garvin, 2003).

1.7 DONADORES DE NO

La generación de NO en los mamíferos puede ocurrir por dos vías:

- a) De manera endógena, a través de la oxidación del aminoácido L-Arginina por la acción enzimática de las sintasas del NO.
- b) De forma exógena mediante la administración de compuestos cuya estructura orgánica favorece la producción de NO *in situ*. Actualmente existen varios tipos de donadores de NO que difieren principalmente en la liberación enzimática o espontánea del NO, así como en sus propiedades químicas y la cinética de liberación (Wang y cols, 2002). De manera general, los donadores de NO se clasifican en donadores directos, cuyos principales representantes son el nitroprusiato de sodio (SNP) y los NONOatos (Schade y cols., 2010; Miller y Megson, 2007). También existen los donadores indirectos en donde se incluye al molsidomine (MOLS), a los nitratos orgánicos (gliceril trinitrato, mononitrato y dinitrato de isosorbide, pentaeritril nitrato) y a los S-nitrosotioles (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) entre otros (Schade y cols., 2010; Willmot y cols., 2005).

Los donadores de NO mimetizan la respuesta del NO endógeno o sustituyen el NO endógeno deficiente. Estos compuestos ejercen como principal función la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GC) por la unión del NO al grupo hemo de la enzima y el incremento intracelular del monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Guix y cols., 2005; Thatcher y cols., 2004; Kelly y Smith, 1996). Estos dos eventos desencadenan a su vez diferentes vías de señalización, entre las que destacan: (a) la ruta antiapoptótica regulada por la cinasa G (PKG), en la que participa además el factor de transcripción CREB y la cinasa Akt. (b) Contestabile y Ciani (2004) reportan que la administración *in vitro* de inhibidores de la GC promueve la apoptosis de neuronas cerebelares por la activación de la caspasa 3; el tratamiento con donadores de NO ejerce un efecto protector, pues el NO liberado nitrosila a la caspasa 3 inhibiendo de este modo su acción. Asimismo, se reportan otros efectos que están asociados a la administración exógena de NO, como: 1) la liberación de diversos NT (GABA, serotonina, GLU, ACh y noradrenalina), 2) la potenciación a largo plazo en el hipocampo y 3) la formación de precursores de moléculas antioxidantes y anti nitrosilantes (bilirrubina) (Calabrese y cols, 2007). Además, el NO juega un papel importante en diversas funciones fisiológicas como la transmisión sináptica, regulación de la presión sanguínea, agregación plaquetaria, relajación de músculo liso, morfogénesis, regulación de la expresión de genes y procesos inhibidores asociados con conducta agresiva y sexual (Luo y Ciskova, 2000; Schmidt y cols., 2001). El NO, también está involucrado en fenómenos de plasticidad como la potenciación o inhibición neuronal de larga duración y en la sensibilización de neuronas espinales (Eisenach, 1997).

1.8 MOLSIDOMINE (MOLS)

La propiedad de radical libre que posee el NO le confiere una vida media demasiado corta, de milisegundos, por lo que prácticamente es imposible poder detectarlo en las diferentes regiones cerebrales. Es por esto que el uso de compuestos donadores permite evaluar la actividad biológica del NO en diversos modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Schade y cols., 2010; Low, 2005).

El MOLS es un donador de NO perteneciente al grupo de pro-fármacos conocidos como sidnoniminas. Hoy en día se conoce al MOLS como un potente vasodilatador en humanos y animales. El MOLS es metabolizado en el hígado por enzimas esterases para generar su primer metabolito, SIN-1 (linsidomine), que posteriormente se descompone en el metabolito donador SIN-1A. La liberación del NO por SIN-1A en la vasculatura se lleva a cabo sin intervención enzimática (Kristek y cols., 2003). Los metabolitos del MOLS son más activos para activar a la GC en comparación con gliceril trinitrato (GTN) (Gerova y Kristek, 2001; Noack y Feelisch, 1989).

Los estudios de la cinética del compuesto demuestran que el tiempo de formación del metabolito activo SIN-1A a partir de SIN-1 es aproximadamente de 126 minutos, lo que permite una ventana de tiempo amplia para el manejo farmacológico y de evaluación conductual de los animales experimentales (Noack y Feelisch, 1989). Algunos estudios indican que 1 mM de SIN-1 podría proveer una concentración estable de 5 mM de NO por 6-8 hrs en solución acuosa (Fagni y Bockaert, 1996; Hess y cols., 1993; Feelisch y cols., 1989).

No obstante que el uso de MOLS no está aprobado en EUA, es ampliamente utilizado en países europeos y en Japón, donde se administra en aquellos pacientes que no responden al régimen farmacológico anti-anginoso regular.

Desde el punto de vista clínico, el MOLS ofrece las ventajas de su presentación farmacéutica, que puede ser en tabletas de 2, 4, 8 y 16 mg, además de la solución

inyectable (2 mg/ml), lo que le confiere una cómoda y superior gama de posibilidades para su administración, sin limitarse exclusivamente a la inhalación o a la aplicación intravenosa (<http://drugs-about.com>). El efecto a largo plazo de MOLS fue evaluado en voluntarios sanos, en los que la formulación de 16 mg una vez al día, generó una concentración plasmática de MOLS de 10 µg/L hasta por 24 horas (Herchuelz y cols., 2004).

Dado que su estructura química difiere de los nitratos orgánicos, MOLS no genera tolerancia ni disfunción endotelial de las arterias coronarias, además carece de efectos secundarios como cefalea. Tampoco provoca procesos aterogénicos como otros donadores (Figura 4), por lo que su uso como un tratamiento a largo plazo está indicado para personas ancianas, sin que disminuya su eficacia (Schade y cols. 2010; Noack y Feelisch, 1989).

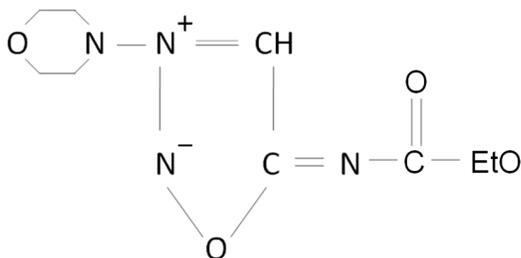


FIGURA 4. Estructura química del molsidomine (N-[etoxicarbonil]-3-[4-morfolinosisidnonimina]. Tomado de Ignarro y cols., 2002.

1.9 PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA COGNICIÓN

El NO es un mensajero retrógrado, cuya acción está relacionada con la liberación pre sináptica de GLU, a través de la activación de la enzima GC y como modulador en mecanismos de plasticidad sináptica como la potenciación hipocampal a largo plazo (LTP)

(Doyle y cols., 1996; O'Dell y cols., 1991) y directamente sobre el desarrollo cognitivo (Da Cunha y cols., 2005; Prast y Philipu, 2001; Moncada y cols, 1991). La intervención del NO en procesos cognitivos está ampliamente demostrada, ya que está reportado que la administración sistémica de compuestos que bloquean a la NOS, como la N^w-nitro-L-arginina metil éster y el 7-nitroindazol (7NI), inhiben el aprendizaje (Kaplan y Miller, 2000; Meyer y cols., 1998; Fin y cols., 1995). Mientras que la administración de compuestos donadores del NO como el MOLS, incrementa este parámetro cognitivo en pruebas de memoria de referencia y de memoria espacial en ratas viejas, MOLS también favorece la adquisición en los paradigmas de evitación pasiva tanto en aves como en ratas, así como la recuperación de la memoria olfatoria en pruebas de reconocimiento social en roedores y la respuesta condicionada de parpadeo en conejos (Majlessi y cols., 2008). Por otro lado, la infusión del 7NI en el giro dentado del HC en ratas, ocasiona alteraciones del aprendizaje en la prueba de evitación inhibitoria, mientras que la administración exógena de MOLS, incrementa el desempeño en la prueba de retención de este mismo paradigma así como en pruebas de memoria de reconocimiento (Van Donkelaar, 2008; Prickaerts y cols., 2004; Pitsikas y cols., 2001, 2002, 2005; O'Dell y cols., 1991).

1.10 SEÑALIZACIÓN POR NO: SOBREVIVENCIA NEURONAL

Uno de los efectos biológicos del NO se asocia con plasticidad neuronal y también con la sobrevivencia celular. Las vías de señalización activadas por NO son complejas e involucran diversos NT, sin embargo, debido a la estrecha relación que existe entre el NO y el GLU a través de su receptor NMDA, la activación glutamatérgica derivada de la estimulación sensorial, el aprendizaje o el incremento de la actividad neuronal, causa la síntesis de NO y la activación del segundo mensajero guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Por su parte, la activación de la GC y el incremento de los niveles del GMPc en el HC y la neocorteza, promueven la expresión de neurotrofinas (NTF) como el factor

neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento neuronal (NGF), que son factores antiapoptóticos y que también participan en la regeneración celular. Un efecto derivado de la producción de NTF promovida por NO; como lo demostraron Chen y Russo-Neustadt (2007) es, que la aplicación de norepinefrina en cultivos de neuronas hipocámpales, incrementa la expresión de BDNF y estimula la señal de sobrevivencia por la cinasa 3' de fosfatidilinositol (PI₃K). Por su parte, el NGF también promueve la sobrevivencia neuronal a través de PI₃K. Como lo demostraron Shimoke y cols. (2005) en estudios de viabilidad celular *in vitro*, la aplicación de taspigargina + un inhibidor de PI₃K alteró el balance del Ca²⁺ en el retículo endoplásmico (REND) y ocasionó muerte celular por apoptosis en células PC12.

Por sí mismo el NO ejerce efectos antiapoptóticos, a continuación se mencionan tres evidencias del papel del NO en la sobrevivencia celular:

1. Está demostrado que la S-nitrosilación de los tioles derivados de residuos de cisteína inhiben la activación de las caspasas 1, 3, 9 y la liberación de Bax (Guix y cols., 2005; Thippeswamy, y cols., 2001).
2. En concentraciones fisiológicas, el NO inhibe la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (Brookes y cols., 2000).
3. Está descrito que NO induce la expresión de genes citoprotectores como el de la proteína de choque térmico 70 (HSP70), que inhibe la dimerización de Apaf-1 previniendo de este modo la formación del apoptosoma (Beere y cols., 2000).

1.11 RELACIÓN ENTRE LOS SISTEMAS COLINÉRGICO Y NITRÉRGICO

La ESC es ampliamente utilizada como una herramienta farmacológica para el estudio y desarrollo de tratamientos protectores contra el déficit cognitivo (Spowart-Manning y cols., 2004). Aunque la estrecha asociación entre el NO y el sistema colinérgico se conoce previamente (Kilbinger, 1996; Kopf y Baratti, 1996; Prast y Philippu, 1992), la protección

del MOLS contra del déficit cognitivo inducido por la ESC, sugiere la participación del NO en la regulación colinérgica asociada al déficit cognitivo (Pitsikas y cols., 2002, 2001). Algunas evidencias experimentales que demuestran la asociación entre el NO y la ACh, se relacionan con modificaciones bioquímicas y funcionales en la CX e HC debidas a la denervación colinérgica ocasionada por la SAP. Entre estas alteraciones se encuentran: la disminución del flujo sanguíneo cerebral y por lo tanto de la perfusión cortical asociada a NO; así como la reducción de la actividad catalítica y de unión a sustrato de la nNOS (Sato y Uchida, 2004; Hartlage-Rubsamen y Schliebs, 2001; He y cols., 2001). La inhibición de la síntesis de NO asociada a hipofunción colinérgica también disminuye la liberación de ACh y GLU; por lo que la participación del HC en procesos cognitivos está modulada por la correlación entre la transmisión colinérgica, glutamatérgica y nitrérgica (Kenney y Gould, 2008; Hopper y Garthwaite, 2006; Driscoll y cols., 2003).

En estudios llevados a cabo para evaluar el efecto modulador del MOLS sobre la hiperactividad en roedores tratados con ESC, se demostró que este donador de NO carece de efecto sobre la actividad motora pues no revierte la hiperactividad; sin embargo favorece el desempeño de los animales en la PRO (Mattson y cols., 2002; Pitsikas y cols., 2001; Magorzata y Przegaliński, 1998). Está ampliamente documentado que las alteraciones de la funcionalidad colinérgica en roedores se asocian con un desempeño deficiente de los animales en pruebas cognitivas hipocampales, como lo es el paradigma de la evitación pasiva (Lorenzini y cols., 1996). Con base en lo anterior, la administración de compuestos como la fisostigmina (inhibidor de la AChE) y la oxotremorina (agonista muscarínico) promueven la recuperación del deterioro cognitivo ocasionado por la inyección de L-NAME en la región CA1 del giro dentado, lo cual igualmente demuestra la relación funcional entre el NO y la transmisión colinérgica (Harooni y cols., 2009).

Es importante mencionar que la función de las células colinérgicas del CBA está asociada a la regulación en la producción de NO y ACh por NGF, pues se sabe que NGF promueve

la expresión y activación de la ChAT en neuronas que expresan NOS (Klein y cols., 1999; Sugaya y cols., 1998; Holtzman y cols., 1994).

En relación con la señalización vía el TrkA-R, otra evidencia experimental que manifiesta la relación del sistema nitrérgico con el sistema colinérgico, se deriva de los ensayos de Sobreviela, y cols. (1998), quienes demostraron mediante inmunohistoquímica de fluorescencia, que las neuronas que expresan la isoforma nNOS en el CBF también co-expresan al receptor TrkA, el cual participa en la vía de señalización de células colinérgicas como se mencionó anteriormente. La plasticidad neuronal asociada al NGF puede disminuir por alteraciones en la transmisión colinérgica proveniente del CBA, lo que ocasiona déficits en el desempeño de pruebas cognitivas en roedores (Domek-Lopacinska y cols., 2005; Henderson y cols., 1996).

Un evento asociado a hipofuncionalidad colinérgica generada por la administración de la SAP en el CBA, se relaciona con la disminución en la expresión del receptor de alta afinidad para el NGF, TrkA-R en núcleos colinérgicos como el SM. Alberch y cols. (1991) demostraron por primera vez que el tratamiento crónico con el antagonista muscarínico ESC (s.c.) en ratas, disminuyó en 50-90% la densidad del TrkA-R en la CX y en el HC, e incrementó el mRNA y los niveles del NGF en estas regiones blanco.

La alteración de la señalización inducida por NGF debida a la disminución del mRNA del TrkA-R, es uno de los aspectos patológicos que se presenta en el deterioro cognitivo moderado y que precede al establecimiento de los procesos demenciales, como la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que en humanos, la disminución de TrkA-R cortical se asocia con el desempeño deficiente en pruebas destinadas a evaluar el estado cognitivo de los pacientes (Mini-Mental State Exam y Global Cognitive Score) (Mufson y cols., 2007).

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo de estrategias farmacológicas dirigidas a la recuperación del déficit cognitivo en modelos experimentales representativos de los mecanismos involucrados en la demencia, podrían facilitar el desarrollo de terapias para combatir los problemas demenciales en humanos. Por lo que el presente estudio analizará el efecto protector del molsidomine sobre el deterioro cognitivo generado a través del modelo experimental con la SAP-IgG 192 en ratas.

3. RELEVANCIA E IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN

Actualmente se carece de tratamientos que controlen de manera efectiva el deterioro cognitivo sin provocar efectos secundarios. Al respecto, existen reportes que muestran que el tratamiento con MOLS en ratas, de manera contraria al uso de otros donadores de NO como el s-nitroso-N-acetil penicilamina y el nitroprusiato de sodio, no genera efectos secundarios adversos y promueve la actividad GABAérgica así como la liberación de ACh en regiones del cerebro como el hipocampo y el estriado. Aunado a lo anterior, la administración de MOLS ha demostrado efectividad en la recuperación del déficit cognitivo inducido por inhibidores de la NOS, como la N_w-nitro-L-arginina y el 3-bromo-7-nitroindazol y en antagonizar el déficit cognitivo inducido por ESC. Estos antecedentes sugieren que el MOLS es un posible candidato como tratamiento efectivo, que promueva el rescate del déficit cognitivo asociado a la demencia en seres humanos, ya que el NO podría favorecer la actividad de las neuronas colinérgicas, modulando así la memoria y el aprendizaje.

4. HIPÓTESIS

Si la administración del molsidomine en ratas adultas es capaz de regular la funcionalidad colinérgica y de esta manera facilitar los procesos asociados a la cognición, entonces su administración en aquellos animales a los que se les induzca déficit cognitivo con la SAP-IgG 192, favorecerá un mejor desempeño en diferentes pruebas cognitivas.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el efecto del molsidomine en la recuperación de la funcionalidad colinérgica en el modelo inducido con la SAP IgG-192, involucra una modulación del sistema nitrérgico.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del molsidomine sobre las alteraciones motoras asociadas a la administración de la SAP IgG-192 en ratas.
2. Evaluar, mediante el desarrollo de pruebas cognitivas, el efecto del molsidomine en el rescate del déficit cognitivo de los animales expuestos a la SAP IgG-192.
3. Analizar histológicamente si el molsidomine evita el daño neuronal y la neurodegeneración inducidos por la SAP IgG-192.
4. Evaluar el efecto del molsidomine sobre los cambios de la población colinérgica septal inducidos por SAP IgG-192.
5. Determinar la participación del molsidomine en la modulación del sistema nitrérgico.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g de peso, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Los animales tuvieron libre acceso a agua y comida y se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad (12/12 hrs).

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana **NOM-062-200-1999**.

6.2 GENERACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO COLINÉRGICO CON SAP

Para el desarrollo del modelo de deterioro cognitivo inducido con SAP IgG-192 (SAP), las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.). Posteriormente se llevó a cabo una microinyección en el SM de 1 µl de SAP IgG-192 (Chemicon Internacional, Temecula CA) (0.2 µg/µl diluida en su vehículo PBS 0.1M pH 7.4), a una velocidad de 0.25 µl/min, permitiendo su difusión durante 3 minutos. Se utilizó un aparato estereotáxico (Stoelting CO 620 Wheat Lane Woodale Illinois USA) asociado a un sistema de inyección automatizado (Dolan Jenner Industries; MI-150). Para la microinyección se empleó una microjeringa de 10 µl (Hamilton Company; Reno, Nevada) y se utilizaron las siguientes coordenadas estereotáxicas: anteroposterior +0.6 mm, lateral 0.0 mm y ventral -7.0 mm con respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 2005). Para evitar infecciones después de la cirugía, a cada rata se le administró 100 µl de gentamicina (Laboratorios

PISA, México) por vía intramuscular y posteriormente fueron colocadas en un espacio con temperatura controlada para su recuperación.

Para generar el grupo control de la lesión, se formó un grupo de ratas a las que se microinyectó en el SM con 1 µl de solución amortiguadora de fosfatos PBS 0.1 M pH 7.4, vehículo de la SAP.

Se formaron grupos experimentales de acuerdo a los tratamientos de administración intraseptal de SAP y su vehículo PBS y a la administración intraperitoneal del molsidomine (MOLS) y su vehículo SSI, como lo indica el cuadro I.

Cuadro I. Resumen de los grupos formados de acuerdo a los tratamientos administrados en el modelo de denervación colinérgica.

	Administración	Intraseptal
Administración i.p.	PBS (0.1 M)	SAP IgG-192 (0.2 µg/µl)
SSI	GRUPO I	GRUPO II
Molsidomine (4 mg/kg)	GRUPO III	GRUPO IV

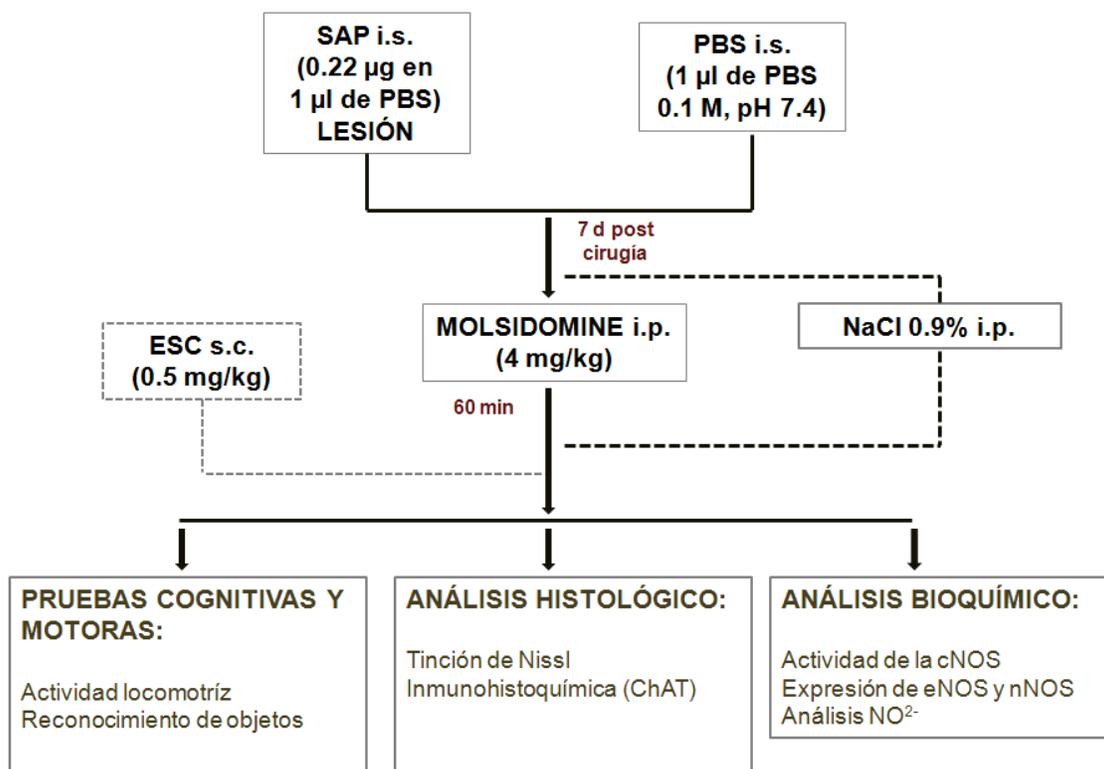
SSI= solución salina isotónica; PBS= solución salina de fosfatos; i.p.= vía intraperitoneal.

Finalmente, las ratas fueron colocadas en cajas en grupos de 5 ó 6 permitiendo libre acceso al alimento y agua durante 7 días posteriores al tratamiento.

6.3 TRATAMIENTO CON MOLS

El tratamiento con el MOLS [N-[etoxicarbonil]-3-[4-morfolinosisidnonimina] (Sigma-Aldrich, México) en dosis única (4 mg/kg, i.p.), se administró 7 días posteriores a la micro inyección de SAP o PBS (0.1 M) y 60 minutos previos a la valoración de la actividad locomotriz y de realizar las pruebas cognitivas, bioquímicas, histológicas e inmunohistoquímicas.

6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL



6.5 VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ

Para descartar alteraciones motoras asociadas a la administración de la SAP o el MOLS, se llevó a cabo la valoración de la actividad locomotriz de las ratas, mediante un sistema automatizado (para evaluar el movimiento de los animales) (Opto-Varimex-Minor; Columbus Instruments; Ohio), acoplado a un sistema detector de fotoceldas que emiten rayos infrarrojos. El sistema cuantifica el número de veces que el animal interrumpe el trayecto de los cuadrantes que los rayos conforman, debido a su actividad motora; a través de la evaluación de la actividad horizontal, vertical y ambulatoria. Está ampliamente demostrado que la administración del amnésico escopolamina (ESC) incrementa la actividad locomotriz en roedores. Por lo que, con la finalidad de contar con un control positivo de hiperactividad (Li y Quock, 2002; Pitsikas y cols., 2002; Pitsikas y cols., 2001; Lamprea y cols., 2000) a un grupo de ratas se le administró ESC (Hidrobromuro de Escopolamina: 0.5 mg/kg, s.c.) (Sigma-Aldrich, México). Posteriormente estos animales fueron inyectados con NaCl (0.9%; i.p.) 60 minutos antes de la valoración de su actividad locomotriz.

La actividad locomotriz de los animales experimentales y controles fue evaluada durante 5 días consecutivos a partir de las 9:00 hasta las 14:30 horas, permitiendo la habituación de las ratas al cuarto de conducta, 20 horas previas a su evaluación. Posteriormente cada uno de los animales de los diferentes grupos experimentales fueron colocados individualmente dentro de la caja de acrílico con la que cuenta el equipo, permitiendo su habituación durante 30 minutos; después de los cuales, fueron registradas las cuentas de actividad locomotriz por 10 minutos.

6.6 PRUEBA COGNITIVA

La funcionalidad cognitiva de los animales tratados se evaluó a través de la prueba de memoria de reconocimiento de objetos (PRO). Previa a la realización del ensayo los animales fueron sometidos a un periodo de habituación durante tres días consecutivos; en los cuales se colocó uno de los objetos que se utilizarían durante la prueba, en la parte central de una caja de acrílico opaca (80 X 80 X 60 cm) y se permitió la exploración de la caja y el objeto de manera individual durante 5 minutos (Sahagón, 2010). Al cuarto día se realizó la prueba experimental, la cual se llevó a cabo en dos etapas: en la fase de muestra se colocó individualmente cada animal dentro de la caja que contenía 2 objetos idénticos; se permitió la exploración de ambos objetos por los animales durante 3 minutos. Posteriormente, las ratas se devolvieron a sus cajas vivienda y se aplicó un intervalo interprueba de 15 minutos. En la fase de elección, cada rata fue colocada nuevamente en la caja de acrílico la cual contenía 2 objetos: uno conocido y otro novedoso. De nuevo se permitió la exploración de los objetos durante 3 min y se registró el tiempo de exploración para cada uno de ellos (Apéndice 2). Se cuantificó el tiempo que las ratas dedicaron a la exploración del objeto previamente mostrado en la etapa de muestra y el objeto novedoso. Se registró el tiempo de exploración para cada uno de los grupos experimentales y control, se obtuvo un índice de discriminación (D) a través de la fórmula: $D = \frac{N-F}{N+F}$, donde N: objeto novedoso y F: objeto familiar (Ennaceur y cols., 2010, 2005; Dudchenko, 2004).

6.7 EVALUACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO MEDIO SEPTAL POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE SAP Y MOLS

6.7.1 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS: Las técnicas histológicas que se realizaron en el presente trabajo fueron: Tinción de Nissl y una técnica inmunohistoquímica para detectar a la colina acetil transferasa (ChAT) en el sitio de lesión.

La obtención de los cortes coronales de SM tanto de los animales controles como de los animales experimentales: se llevó a cabo bajo condiciones de anestesia, cada rata se perfundió por vía intracardiaca con 250 ml de una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en solución amortiguadora de fosfatos (PB; 0.2 M, pH 7.2-7.4); previamente a la perfusión con la solución fijadora, se llevó a cabo un proceso de lavado con 250 ml de PBS 0.1 M (pH 7.2-7.4). Se extrajeron los cerebros y posteriormente se colocaron en la misma solución fijadora durante 24 hrs a temperatura ambiente, llevándose a cabo dos ciclos de lavado de 30 min cada uno con PB 0.2 M (pH 7.2-7.4) y se guardaron en solución amortiguadora de fosfatos salina a 4°C hasta su inclusión en bloques de parafina. Mediante un micrótopo Leica RM2125RT (Leica Microsystems Nussioch GmbH, Alemania) se obtuvieron secciones coronales de 7 μ m, colocando cada tercer corte por triplicado en portaobjetos silanizados con el fin de incluir tres regiones del SM de acuerdo con las coordenadas anteroposteriores: +0.8, +0.6 y +0.36 respecto a Bregma (Paxinos y Watson, 2005) y se guardaron a temperatura ambiente. Un grupo de laminillas se destinó para la técnica histológica de Nissl y otro grupo para la inmunotinción contra la ChAT. Para ambas técnicas se obtuvieron microfotografías (40X) de la región del SM mediante una cámara acoplada al microscopio óptico (Olympus) y se realizó un conteo celular utilizando analizador de imágenes (Image PRO-plus, MediaCybernetics, USA).

6.7.2 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS SEPTALES MEDIANTE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA DE NISSL

Este análisis se llevó a cabo para detectar el efecto del NO sobre las alteraciones morfológicas y los cambios en la población de neuronas septales producidos por la inyección de la SAP.

Los cortes coronales de SM destinados al análisis histológico se desparafinaron incubando las laminillas correspondientes, en una estufa a 50°C durante toda la noche. Antes de la tinción, se llevó a cabo la hidratación gradual de las secciones de SM colocando los portaobjetos en una solución de xilol absoluto (2 cambios) y posteriormente en alcoholes (100°, 96°, 80° y 70°) durante 3 minutos. Finalmente, los cortes se lavaron con agua destilada. Los portaobjetos con las secciones de SM se colocaron en una solución del colorante violeta de cresilo 0.1% por 10 minutos a 60°C (Ríos y col., 2009; Gridley, 1953). Posterior a este tiempo, se lavaron en agua destilada y se deshidrataron en alcoholes graduales hasta colocar las laminillas en xilol absoluto, previo al montaje de los cortes con resina (Entellan) para su evaluación microscópica. Finalmente se cuantificaron las células septales sin alteraciones morfológicas presentes en todas las microfotografías de los grupos SAP, MOLS, SAP+MOLS y control (PBS).

6.7.3 INMUNODETECCIÓN DE LA TRANSFERASA DE ACETIL COLINA (ChAT)

Con el fin de evaluar la integridad de las neuronas colinérgicas, a través de la expresión de la ChAT como marcador del déficit colinérgico asociado a la inyección intraseptal de la SAP; se llevó a cabo el montaje de un método inmunohistoquímico para determinar los cambios en la densidad poblacional de las células positivas a ChAT en el SM de los animales expuestos a los diferentes tratamientos.

Previo a la inmunotinción, los cortes se desparafinaron, incubando los portaobjetos en una estufa a 50°C durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo, se llevó a cabo un proceso de hidratación gradual colocando las laminillas en una solución de xilol absoluto y posteriormente en alcoholes (100°-70°) hasta la hidratación total de las secciones. Para la recuperación del antígeno se colocaron los cortes en una solución de citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) durante 30 minutos a 100°C y se lavaron con agua destilada para su posterior incubación con una solución de H₂O₂ al 3% en metanol. Esto se llevó a cabo para eliminar la actividad de peroxidasas endógenas. Previo a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, los cortes se colocaron en una solución amortiguadora Tris salina/Tween (TBST) 0.05 M (pH 7.4) y se incubaron protegidos de la luz durante toda la noche a 4°C, con la solución del anticuerpo primario contra la ChAT, diluido 1:100 (Chemicon Internacional, Temecula, CA) en una solución amortiguadora de TBST. Después de lavar con TBST, las secciones se incubaron con una solución de anticuerpo secundario biotinilado (Dako, Carpinteria CA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo la detección con estreptavidina (Dako, Carpinteria CA) y el revelado (5 segundos) utilizando una solución de diaminobenzidina (Dako, Carpinteria CA). Finalmente, los cortes se lavaron con agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina, se montaron para la obtención de las imágenes fotográficas y se realizó un conteo de las células positivas a ChAT. Como control de la técnica se utilizó un anticuerpo primario contra la proteína fibrilar glial ácida, diluido 1:300 (GFAP; Dako Als, Dinamarca) y como control negativo se utilizaron cortes de SM e hipocampo, los cuales no estuvieron en contacto con el anticuerpo primario correspondiente.

6.8 EVALUACIÓN DEL SISTEMA NITRÉRGICO EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE SAP Y MOLS

6.8.1 ACTIVIDAD DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO (NOS)

La participación del NO en la modulación del sistema nitrérgico en la terminal sináptica, fue evaluada indirectamente mediante la técnica descrita por Bredt y Synder (1990) y modificada por Pérez-Severiano para tejido cerebral (2008). La técnica mide la actividad de la NOS evaluando la conversión estequiométrica de la L-arginina a L-citrulina más NO. El hipocampo (HC), la corteza prefrontal (CX) y el cuerpo estriado (ST) de los animales sometidos a los diferentes tratamientos experimentales, fueron disecados sobre hielo y colocados en un criotubo que fue depositado en nitrógeno líquido. Posteriormente todas las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

Para la medición de la actividad de NOS cada tejido fue homogenizado en un volumen de 250 μl de una mezcla de inhibidores de proteasas disueltos en una solución reguladora, la cual contenía: 50 mM de Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1nM β -mercaptoetanol a pH de 7.5. La solución final de inhibidores fue preparada obteniendo las siguientes concentraciones finales 100 mM de leupeptin, 1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF) a partir de un stock de 100 mM disuelto en etanol, 2 mg/ml de aprotinina, 10 mg/ml de inhibidor de soya tripsina (SBTI) y 0.1 % (v/v) de noninet-40. Posteriormente cada muestra con un contenido de 500 μg de proteína, fue incubada durante 30 minutos a 37°C en presencia de los siguientes cofactores (todos a concentraciones finales en un volumen máximo de reacción de 100 μl): 1 mM NADPH, 100 nM de calmodulina, 30 μM de tetrahidrobiopterina y 2.5 mM CaCl_2 . La mezcla de reacción también contenía 10 μM L-arginina-HCl y 0.2 μCi de ^3H -L-arginina (Amersham, aproximadamente 66 Ci/mmol). Los volúmenes finales de cada reacción fueron ajustados a 100 μl con una solución reguladora. Transcurrido el tiempo de incubación, la reacción fue detenida adicionando 1

ml de una solución amortiguadora de paro (2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH=5.5). La mezcla de reacción (volumen final de 1.1 ml), fue transferida a una columna conteniendo 2.5 ml de resina de intercambio iónico (Dowex-50W), la cual fue capaz de retener a la L-arginina marcada y permitió que la L-citrulina fluyera a través de la columna; posteriormente, a cada eluyente de la mezcla de reacción se le adicionó 5 ml de líquido de centelleo Aquasol-2 (New England Nuclear) para su cuantificación en un contador de centelleo (Beckman LS6500). Para evaluar la actividad de la iNOS, las muestras se incubaron en presencia de EGTA (0.1 mM) y sin CaCl₂. La actividad enzimática se expresó como [³H]-L-citrulina/500 µg de proteína/30 minutos. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry, a una longitud de onda de 550 nm.

6.8.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA NOS CONSTITUTIVA (nNOS y eNOS)

Se llevó a cabo un ensayo de Western blot con las mismas muestras homogenizadas de CX, ST e HC utilizadas en el análisis de la actividad de NOS. Con la finalidad de analizar la expresión de eNOS y nNOS se utilizaron los volúmenes necesarios para una cantidad estandarizada de 30 µg de proteínas, los cuales se depositaron en un gel de Tris/glicina-sulfato de dodecil de sodio-poliacrilamida al 10% para su separación. Posterior a la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride membrane*, Amersham Biosciences, UK). Cada membrana se bloqueó con una solución de TBS/leche descremada al 5% y Tween al 0.05%, durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron a 4°C durante toda la noche, con la solución correspondiente de los anticuerpos hechos en ratón (monoclonal) y conejo (policlonal) dirigidos contra la nNOS y eNOS respectivamente (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), ambos a una dilución final de 1:300. Como control

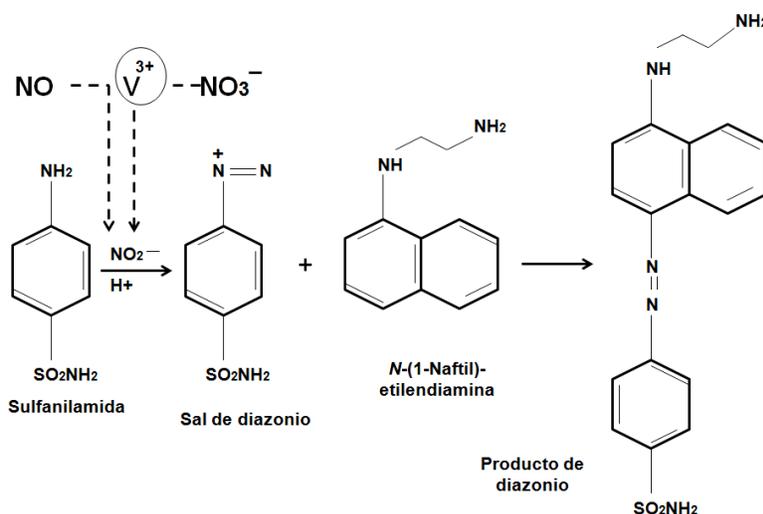
de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal hecho en ratón contra la β -actina. La membrana se lavó e incubó con el correspondiente anticuerpo secundario contra conejo y ratón (Zymed) a una dilución de 1:3000 para la detección de eNOS y 1:1000 para la nNOS, en una solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se llevaron a cabo tres lavados más. Las bandas de interés se revelaron con un sistema de detección ECL (Perkin Elmer Inc, Waltham MA, USA). Cada banda se digitalizó usando el sistema BioDoc-It (UVP, CA, USA) y se llevó a cabo un análisis densitométrico usando el programa Lab Works™ 4.0 Image Acquisition and Analysis Software (UVP, CA, USA). Los resultados se expresaron como el porcentaje de densidad óptica normalizado con la expresión de β actina.

6.8.3 EVALUACIÓN DE LOS METABOLITOS DEL NO: NO₂⁻

Con la finalidad de determinar el estado nitrérgico en diferentes regiones cerebrales, se llevó a cabo la evaluación de nitritos (NO₂⁻) por el método descrito por Miranda y cols. (2001) y modificado por Tenorio y cols. (2005). Los animales, expuestos a las diferentes condiciones experimentales se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron las regiones cerebrales: CX, ST e HC, las cuales se conservaron a -70°C hasta su procesamiento. Posteriormente las muestras se homogenizaron con una solución amortiguadora y se centrifugaron a 16000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron 20 μ l de la muestra a los que se añadieron 100 μ l de una solución de cloruro de vanadio (III) al 8% en ácido fosfórico 1 M (Sigma-Aldrich, St Louis MO), 50 μ l de sulfanilamida 2% en ácido fosfórico al 5% y 50 μ l de diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina 0.2% en agua destilada (Sigma-Aldrich, St Louis MO) y se incubaron por 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 3 ml de agua destilada a cada tubo de reacción. Los nitritos presentes en las muestras se

cuantificaron mediante un espectrofotómetro de doble haz a 540 nm (modelo DW-2000, SLM-Aminco, USA) (Miranda y cols., 2001).

La cuantificación de los NO_2^- como se explica en el siguiente esquema, se llevó a cabo mediante la reacción colorimétrica de Griess, modificada por Tenorio y cols., (2005). Esta reacción involucra la reducción de los nitratos (NO_3^-) de la muestra a NO_2^- por el vanadio (V) y la formación de un cromóforo a partir de la diazoación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguido del acoplamiento con una amina bicíclica.



6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados fueron expresados como el promedio \pm el error estándar. Los datos correspondientes a la actividad locomotriz de las ratas, así como el conteo celular, la actividad enzimática, la expresión y el índice de discriminación fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguida de la prueba *post hoc* de Tukey. Se utilizó el programa estadístico SPSS (versión 17.0).

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del molsidomine sobre las alteraciones motoras asociadas a la administración de la SAP IgG-192 en ratas (objetivo 1).

Con el propósito de analizar si la SAP y el MOLS ocasionan alteraciones motoras que afecten el desempeño de los animales durante la prueba cognitiva, se decidió evaluar la actividad locomotriz de los animales experimentales y controles. La evaluación de la actividad locomotriz de los animales experimentales se dividió para su análisis en tres componentes: actividad locomotriz horizontal, vertical y ambulatoria.

Actividad locomotriz horizontal: Este tipo de actividad se cuantifica por la interrupción de los rayos emitidos por 8 fotoceldas cuando un animal se desplaza de un sitio a otro. Aunque los resultados obtenidos muestran un aumento aparente en el promedio de cuentas horizontales de 511.38 ± 104.5 y 421.31 ± 66.83 en los animales que recibieron la SAP y el MOLS respectivamente, en comparación con el grupo control (PBS, 347.06 ± 57.42), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 1). El grupo administrado con ESC, mostró incremento de la actividad estadísticamente significativo (1198.62 ± 113.5) respecto a los animales controles (Figura 5A).

Actividad locomotriz vertical: Esta prueba valora el número de ocasiones en que un animal se levanta sobre sus miembros posteriores. La actividad locomotriz vertical se encuentra asociada a la exploración por lo que un número elevado de cuentas verticales, se traduce a un comportamiento irregular, ya que no suele ser una conducta recurrente en condiciones normales. Las cuentas verticales realizadas por las ratas de los grupos experimentales SAP, MOLS y SAP+MOLS mostraron valores promedio de 121.6 ± 34.14 , 83.4 ± 19.72 y 60.7 ± 18.67 respectivamente con relación al grupo PBS: 63.4 ± 13.61 (Tabla 1). Al comparar el número de cuentas verticales de estos grupos, no se

encontraron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, la administración de la ESC incrementó significativamente (409.7 ± 63.16) la actividad locomotriz vertical de las ratas tratadas con respecto a sus controles (Figura 5B).

Actividad locomotriz ambulatoria: Esta conducta define a los movimientos que realiza un animal sin desplazarse e incluye movimientos de acicalamiento, sobresalto o estereotipias. Los resultados obtenidos en los animales que recibieron la SAP, MOLS y la combinación SAP+MOLS no fueron estadísticamente diferentes del grupo control (142.1 ± 27.51), a pesar de que los valores de su actividad ambulatoria fueron de 251.6 ± 67.30 , 201.4 ± 47.18 y 158.4 ± 47.56 , respectivamente (Tabla 1). Con respecto al número de cuentas en los animales tratados con ESC, éste se incrementó 5 veces (760 ± 97.94) en comparación con el grupo PBS (Figura 5C).

Tabla 1. Actividad locomotriz posterior a la administración de MOLS ó SAP.

GRUPO	ACTIVIDAD		
	HORIZONTAL	VERTICAL	AMBULATORIA
PBS	347.06±57.42	63.4±13.61	142.1±27.51
SAP	511.38±104.5	121.4±34.14	251.6±67.30
MOLS	421.31±66.83	83.4±19.72	201.4±47.18
SAP+MOLS	335.06±75.51	60.7±18.67	158.4±47.56
ESC	*1198.62±113.5	*409.7±63.16	*760.2±97.94

* ANOVA post hoc Tukey, $p < 0.05$ (vs grupo PBS)

Los resultados sugieren que la administración intraseptal de la SAP no modifica la actividad motora, por lo que la evaluación del déficit cognitivo asociado al modelo experimental es confiable. Por lo tanto, se consideró que las variaciones cognitivas que

presenten los animales inyectados con SAP se originan por la alteración del sistema colinérgico y no por factores ajenos que pudieran afectar el desempeño motor de los animales para la resolución de la prueba cognitiva.

Debido a que el MOLS tampoco ocasionó cambios en la actividad locomotriz, la administración de este fármaco se consideró confiable para evaluar el efecto del NO sobre la recuperación cognitiva de los animales inyectados con la SAP.

7.2 Evaluación del efecto del molsidomine en el rescate del déficit cognitivo de los animales expuestos a la SAP IgG-192 (objetivo 2).

Una vez que se demostró que no existen cambios significativos de la actividad motora y la inyección de la SAP, se evaluó el desempeño cognitivo de los animales lesionados mediante la PRO.

La administración intraseptal de la SAP, 7 días previos a la realización de la PRO, disminuyó la exploración del objeto novedoso con respecto al objeto familiar durante la fase de elección de la prueba (Figura 6). Esto se verificó por que se obtuvo un menor índice de discriminación promedio (0.23 ± 0.08) con respecto al grupo control (PBS: 0.69 ± 0.10). Estos resultados sugieren que la inmunotoxina SAP disminuyó la adquisición. El aspecto más relevante de la prueba fue que la administración del MOLS, 60 minutos previos a la etapa de elección, incrementó significativamente el índice de discriminación promedio en el grupo SAP+MOLS (0.77 ± 0.08), en comparación con el grupo SAP (0.23 ± 0.08), lo que sugiere que el NO moderó el déficit cognitivo causado por la inmunotoxina y favoreció la recuperación cognitiva al incrementar la memoria de reconocimiento.

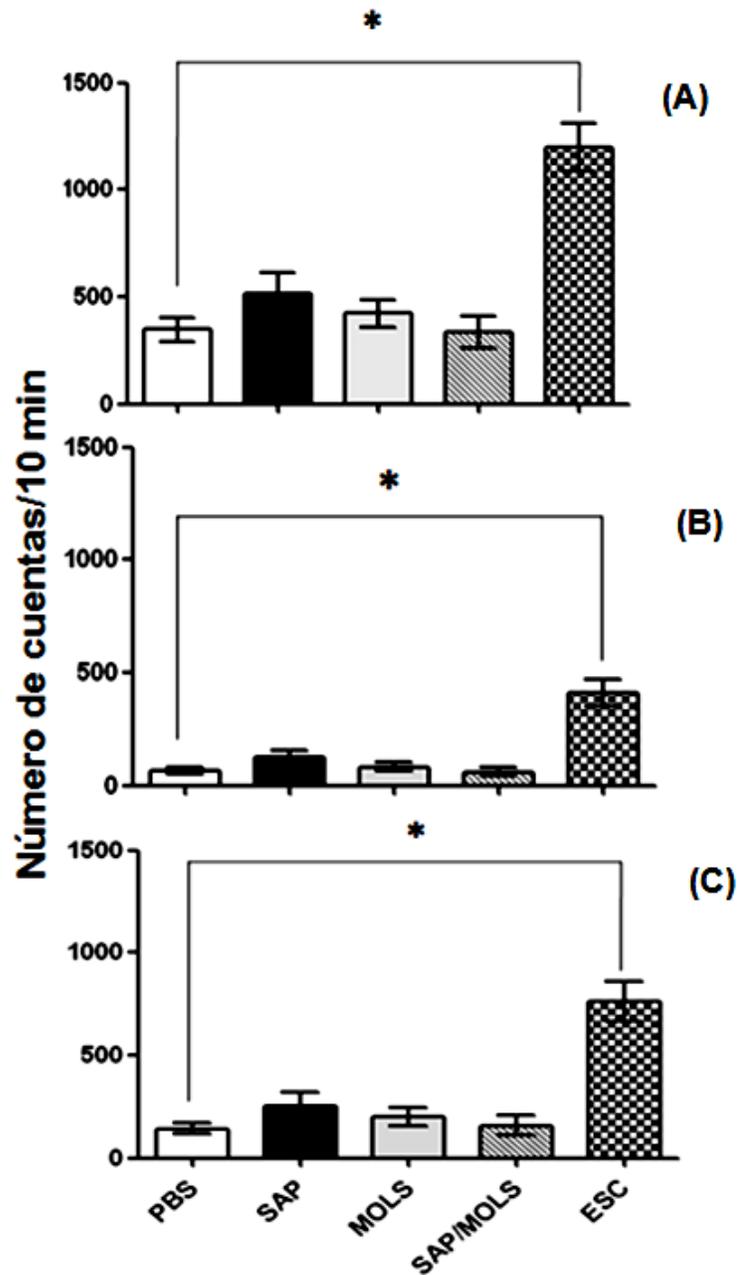


Figura 5. Actividad locomotriz total de los animales inyectados con SAP y su control posterior a la administración de MOLS. (A) Actividad locomotriz horizontal, (B) vertical y (C) ambulatoria. Cada barra representa el promedio del número de cuentas obtenido en 10 minutos \pm error estándar (n=13-16). *ANOVA $p < 0.05$, *post hoc* Tukey.

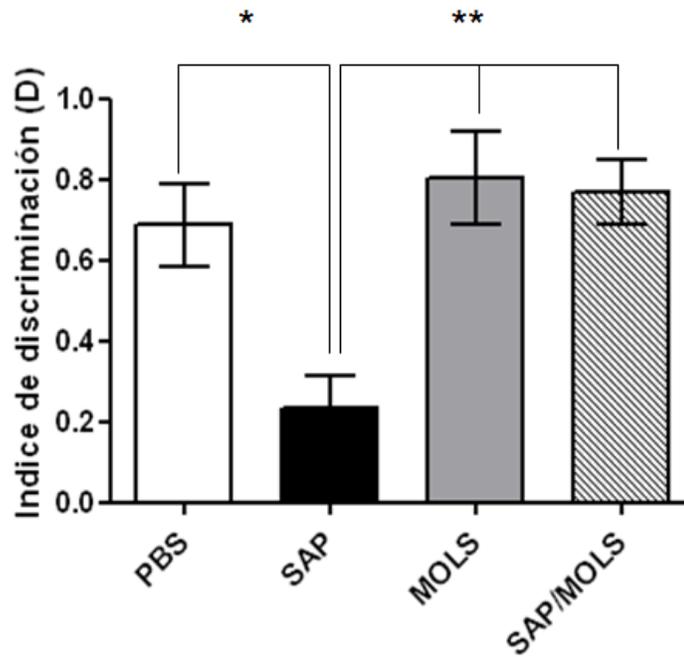


FIGURA 6. Índice de discriminación del objeto novedoso posterior a la administración de SAP y MOLS. Las barras representan el índice promedio \pm error estándar. * ** ANOVA $p < 0.05$ ($n=7$), *post-hoc* Tukey.

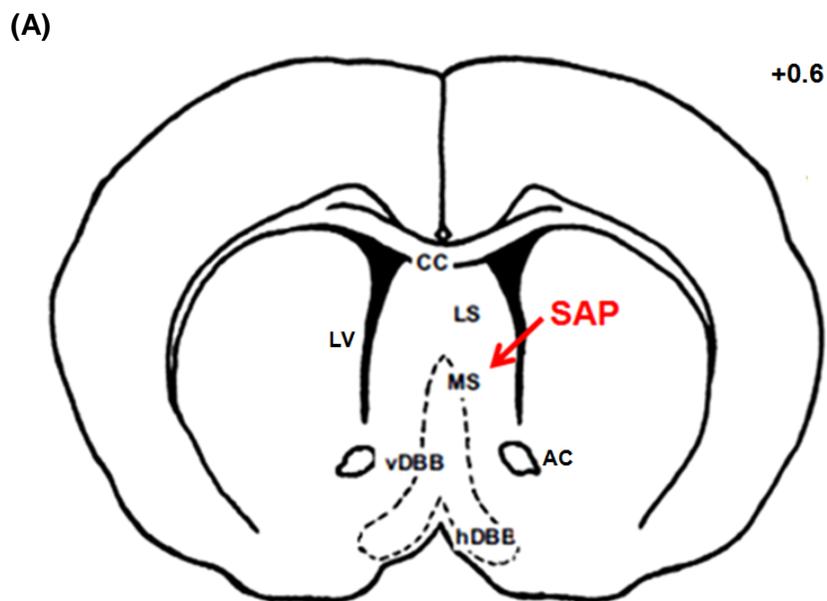
7.3 Evaluación histológica del efecto del molsidomine sobre el daño neuronal y la neurodegeneración inducidos por la SAP IgG-192 (objetivo 3).

Como se mencionó en los antecedentes, uno de los eventos patológicos asociados a la administración de la SAP en el SM, es la despoblación celular en el sitio de lesión (Perry y cols., 2001). Por lo anterior, es posible sugerir que el desempeño erróneo por parte de los animales inyectados con la SAP, tenga correlación con la disminución de neuronas que participan en la discriminación del objeto novedoso. Con el fin de identificar las alteraciones morfológicas y los posibles cambios en la población de neuronas del septales, asociados a la inyección de la inmunotoxina SAP, así como para dilucidar si el mecanismo efectuado por el NO, podría estar dirigido a evitar el daño neuronal inducido por SAP, se llevó a cabo la técnica histológica de Nissl en cortes coronales de SM (Figura 7).

El análisis cualitativo derivado de la tinción con violeta de cresilo demostró que la administración de SAP disminuyó la población de neuronas del *septum* en comparación con el grupo control (PBS, 126.0 ± 2.97 ; SAP, 63.79 ± 1.33) y con el grupo MOLS (143.7 ± 5.10) (fig. 8A). La microfotografía representativa del grupo SAP, muestra varios cuerpos celulares picnóticos (somas fusiformes, encogidos y condensados de color oscuro), con núcleos pleomórficos (apenas visibles, deformados y algunos sin nucléolo evidente). También se observan algunas células sin picnosis pero de menor volumen y aspecto deformado. Estas alteraciones son más evidentes a mayor aumento (Figura 8B). No se observaron cambios de la densidad poblacional con respecto al grupo que recibió la combinación SAP+MOLS (53.19 ± 0.58). La microfotografía del grupo SAP+MOLS muestra cuerpos celulares alterados y similares a los presentes en el grupo SAP en coexistencia con células que conservan su morfología normal, la cual se aprecia mejor preservada en este grupo que la que presentan las células aparentemente conservadas del grupo SAP.

Al analizar la morfología celular del grupo PBS y del grupo MOLS, se observaron células con morfología normal, con somas grandes en su mayoría redondos, en los que se observa el núcleo y nucléolo bien definidos (Figuras 8A y B).

La disminución celular del *septum* medial se comprobó al realizar un conteo celular. La dosis administrada de SAP ($0.22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) causó la pérdida del 49% de neuronas septales y MOLS no incrementó la densidad poblacional en el sitio de lesión, ya que la reducción del número de células del grupo SAP+MOLS fue del 58%. Esta disminución fue estadísticamente significativa para ambos grupos comparado con el control (Figura 9).



(B)

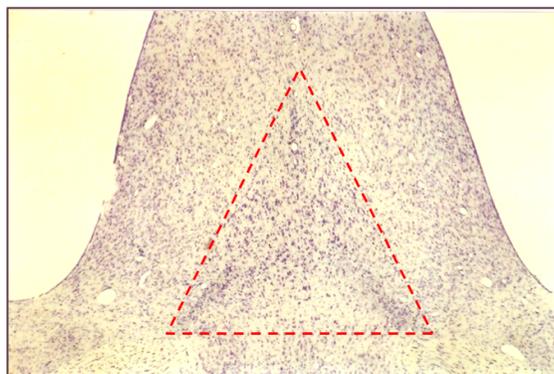
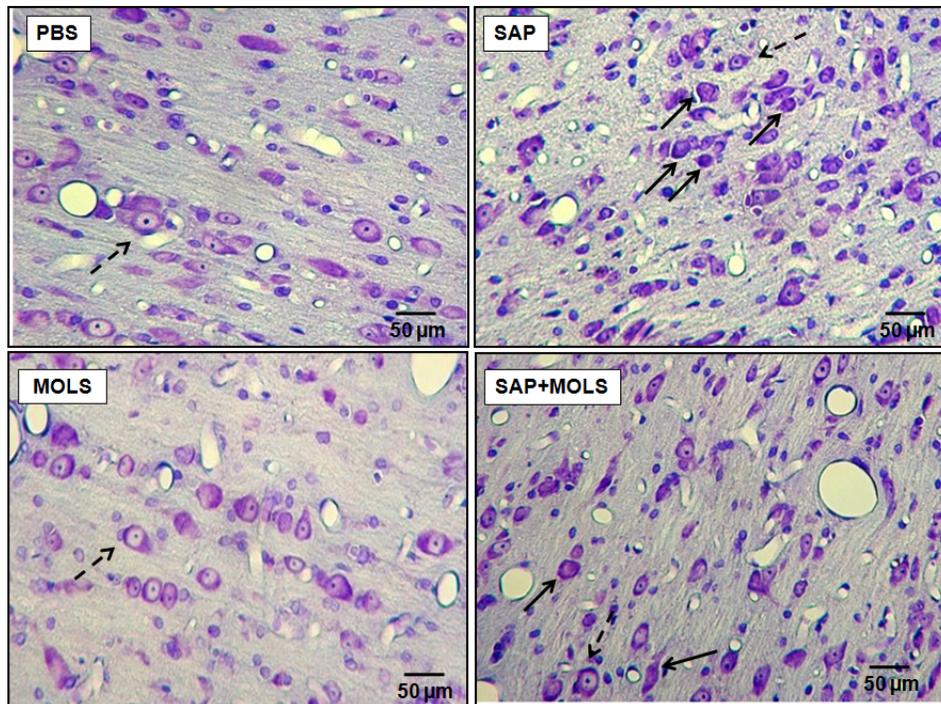


FIGURA 7. (A) Esquema que representa el sitio de lesión de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (2005). La ubicación correcta del nivel del *septum* medial considerado para el análisis histológico e inmunohistoquímico se llevó a cabo en función del grosor y forma de cuerpo calloso (CC), así como de la forma de los ventrículos laterales (LV) y de las comisuras anteriores (AC). **(B)** Microfotografía representativa del SM teñido con violeta de cresilo. Se muestra el arreglo de las neuronas septales que en conjunto definen una estructura triangular, la cual está delimitada por las líneas rojas discontinuas. En esta región se realizó el análisis cualitativo y el conteo celular derivados de la técnica histológica de Nissl y de la inmunodetección para la ChAT, en los cortes coronales correspondientes.

(A)



(B)

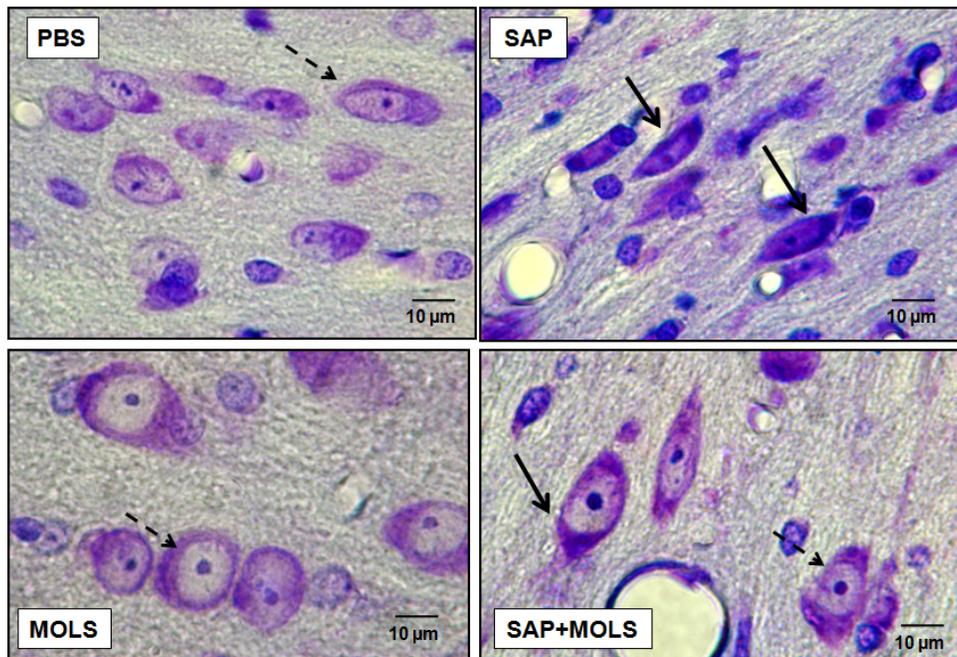


FIGURA 8. (A) Microfotografías representativas del sitio de lesión en las que se muestran los cambios en la población de neuronas septales. Con las flechas discontinuas se señalan los somas de morfología normal y con las flechas continuas aquellos con alteraciones morfológicas. La tinción histológica de Nissl se llevó a cabo posterior a 7 días de la administración de la SAP. Escala: 50 µm (20X). **(B)** Alteraciones morfológicas de neuronas septales asociadas a la administración de SAP. Escala: 10 µm (100X).

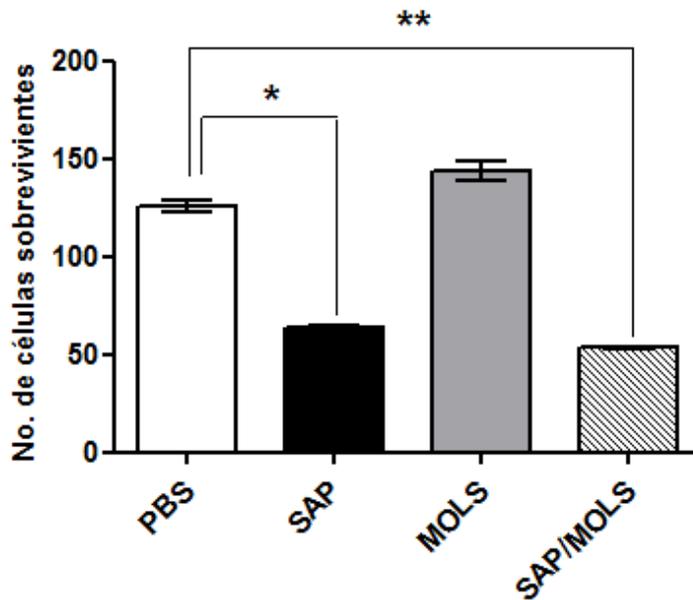


FIGURA 9. Número de células vivas en el *septum* medial posterior a la administración de SAP ó MOLS y el control PBS. * ** ANOVA $p < 0.05$ ($n=3$), *post hoc* Tukey.

7.4 Efecto del molsidomine sobre los cambios de la población colinérgica septal inducidos por SAP IgG-192 (objetivo 4).

Para determinar si el MOLS tenía efecto en la recuperación de la población colinérgica, se llevó a cabo la inmunodetección de la ChAT en cortes coronales de SM. La estimación cualitativa reveló que la SAP (35.72 ± 4.97) disminuyó la densidad de células positivas (somas de color café) en comparación con el grupo PBS (60.02 ± 7.66) y con el grupo MOLS (60.11 ± 9.87). Sin embargo, no se observaron cambios con respecto al grupo SAP+MOLS (31.50 ± 2.25) (Figura 10).

Estos resultados fueron congruentes con los resultados obtenidos del conteo de células positivas a ChAT. De acuerdo con lo esperado, la SAP redujo el 41% de la población celular colinérgica del *septum* medial; sin embargo, MOLS no tuvo efecto

estadísticamente significativo en la recuperación poblacional, ya que el porcentaje de reducción celular en el grupo SAP+MOLS fue del 48% (Figura 11).

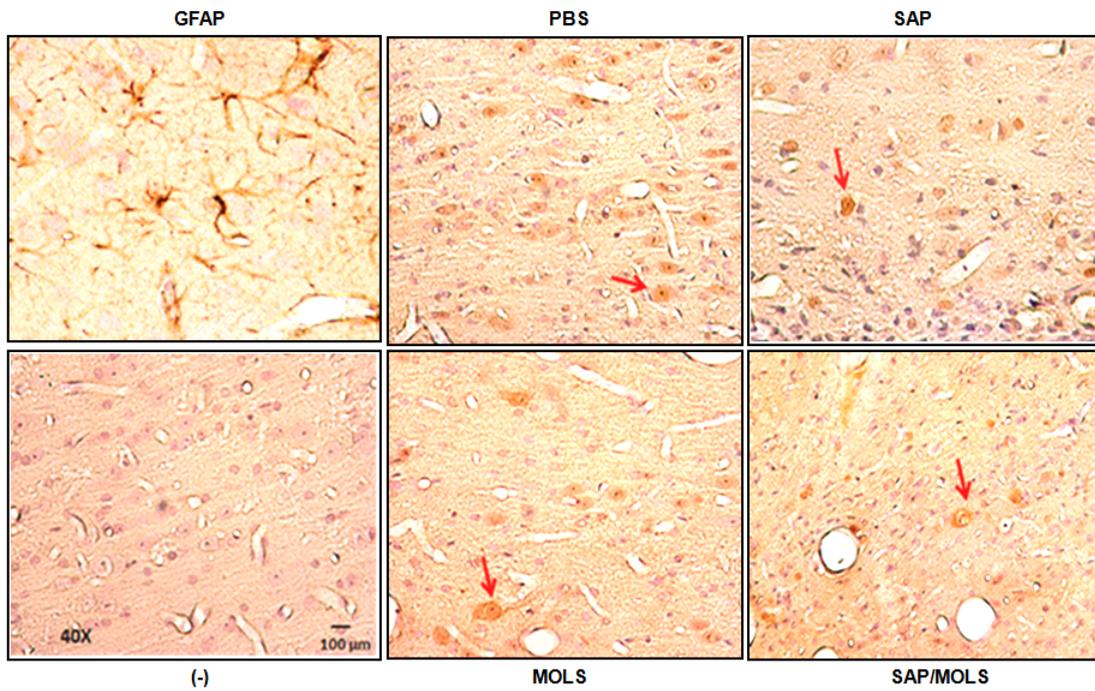


FIGURA 10. Microfotografías representativas del inmunomarcaje contra la ChAT en el SM para las diferentes condiciones experimentales. Escala: 100 µm (40X).

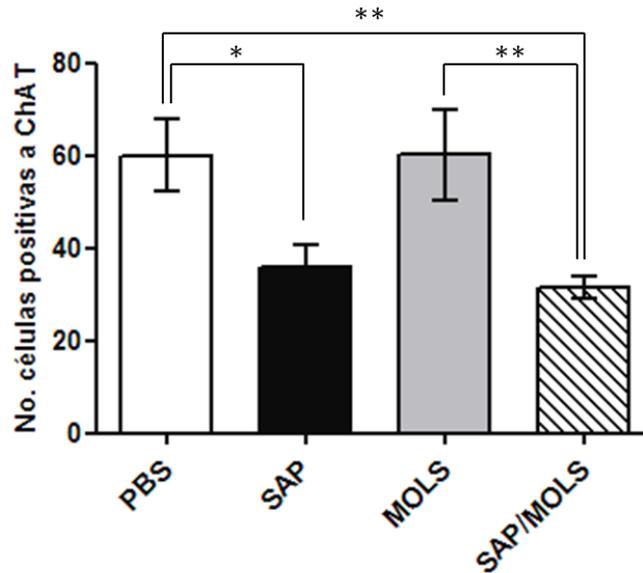


FIGURA 11. Análisis cuantitativo de las células positivas a ChAT en los diferentes grupos experimentales y el control. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * ** $p < 0.05$, ANOVA *post hoc* Tukey.

7.5 Participación del molsidomine en la modulación del sistema nitrérgico (objetivo 5).

Para determinar el efecto del MOLS sobre las alteraciones funcionales del sistema nitrérgico asociadas al modelo de denervación colinérgica inducido por SAP, se analizaron diferentes parámetros nitrérgicos en el HC. También se analizaron las regiones de la CX y el ST, las cuales fueron utilizadas como región de referencia.

7.5.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA cNOS

La administración de la SAP en el núcleo colinérgico del *septum* medial provocó la disminución significativa de la actividad enzimática en CX (123.9 ± 9.42) y en ST (231.2 ± 9.26) en comparación con el grupo control PBS (CX: 245.8 ± 23.31 ; ST: 358.8 ± 10.95). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo al que se

administró solamente MOLS (CX: 239.5 ± 7.39 ; ST: 355.5 ± 27.96) y el control, en ambas regiones (CX: 245.8 ± 23.31 ; ST: 358.8 ± 10.95). Contrario a lo esperado y a lo reportado en la literatura, no se observó ningún efecto en el HC sobre la actividad enzimática, relacionado con la inyección de la SAP (258.6 ± 20.33) con respecto al grupo PBS (291.5 ± 17.77) (Figura 12).

El aspecto más importante de este análisis se refiere a la recuperación cortical y estriatal de los niveles basales de actividad de la cNOS, posterior a la administración de MOLS, como se demuestra con los datos de la actividad enzimática del grupo SAP+MOLS (CX, 261.8 ± 27.9 ; ST, 358.2 ± 31.47) en comparación con los datos del grupo SAP (CX, 123.9 ± 9.42 ; ST, 231.2 ± 9.26) (Figura 12). En el HC, la SAP no tuvo efecto sobre la actividad de cNOS. El suministro exógeno de NO por el donador MOLS, incrementó la actividad enzimática (384.5 ± 9.18) con respecto al grupo PBS (291.5 ± 17.77).

Es importante mencionar que el nivel de actividad de la iNOS (CX, 35.61 ± 8.22 ; ST, 47.21 ± 6.74 ; HC, 46.82 ± 3.80) estuvo por debajo del nivel basal observado para el grupo control de la cNOS (CX, 245.8 ± 23.31 ; ST, 358.8 ± 10.95 ; HC, 291.5 ± 17.77) y no se encontraron diferencias entre los grupos SAP, MOLS y SAP+MOLS en las tres regiones analizadas, en comparación con sus correspondientes controles (Tablas 2-4).

Tabla 2. Actividad promedio de iNOS (n=7) en CX posterior a la administración de SAP y

MOLS	
GRUPO	ng L-cit/500 μg prot/30 min
PBS	35.61 ± 8.22
SAP	34.75 ± 7.33
MOLS	42.89 ± 7.59
SAP+MOLS	34.46 ± 6.57

Tabla 3. Actividad promedio de iNOS en ST (n=7) posterior a la administración de SAP y

MOLS	
GRUPO	ng L-cit/500 µg prot/30 min
PBS	47.21±6.74
SAP	43.57±4.22
MOLS	44.61±1.65
SAP+MOLS	45.33±2.71

Tabla 4. Actividad promedio de iNOS en HC (n=7) posterior a la administración de SAP y

MOLS	
GRUPO	ng L-cit/500 µg prot/30 min
PBS	46.82±3.80
SAP	41.33±3.29
MOLS	47.69±3.99
SAP+MOLS	48.39±5.95

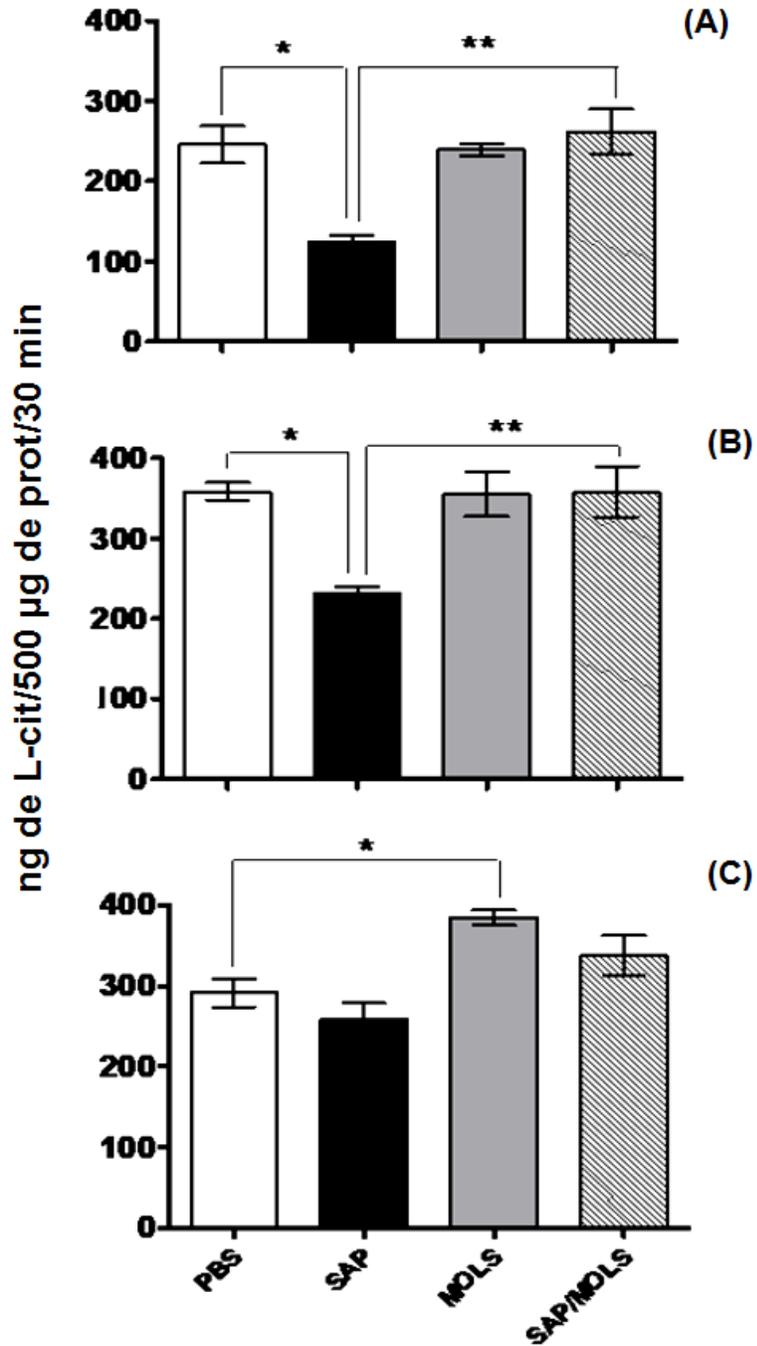


FIGURA 12. Cambios en la actividad de la cNOS en: (A) corteza prefrontal, (B) cuerpo estriado e (C) hipocampo. Las barras representan el promedio \pm error estándar. ANOVA * ** $p < 0.05$ (n=7), *post hoc* Tukey.

7.5.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA nNOS y eNOS

Este ensayo se llevó a cabo para determinar si la expresión de las isoformas endotelial y neuronal de la NOS en conjunto, tenía una correlación con la actividad de la cNOS.

Los resultados densitométricos demostraron que la administración de SAP disminuyó significativamente los niveles de la nNOS cortical (31.32 ± 4.75) con respecto al control PBS (75.64 ± 10.35). Los datos correspondientes a la expresión del grupo SAP+MOLS mostraron incremento en la expresión de la nNOS (48.35 ± 6.40) con respecto al grupo al que se administró SAP (31.32 ± 4.75) y no fueron estadísticamente diferentes en comparación con el control (75.64 ± 10.35) y con el grupo inyectado con MOLS (58.12 ± 6.23) (Figura 13A). Sin embargo, en el ST y el HC no se observaron cambios aparentes y estadísticamente significativos en la expresión de la nNOS en los grupos SAP (ST, 85.34 ± 9.29 ; HC, 49.50 ± 14.56), MOLS (ST, 91.56 ± 9.91 ; HC, 51.37 ± 7.72) y SAP/MOLS (ST, 93.49 ± 1.61 ; HC, 52.10 ± 13.52) con respecto al grupo PBS (ST, 90.21 ± 5.65 ; HC, 44.58 ± 9.89) (Figuras 13B y C).

Por otra parte, la expresión de la eNOS tampoco reveló cambios en los niveles de la proteína para los diferentes grupos de tratamientos: SAP (CX, 39.65 ± 11.65 ; ST, 41.11 ± 11.36 ; HC, 59.36 ± 21.72), MOLS (CX, 56.67 ± 5.96 ; ST, 37.19 ± 19.56 ; HC, 74.60 ± 18.35), SAP/MOLS (CX, 48.59 ± 11.47 ; ST, 56.18 ± 8.67 ; HC, 90.90 ± 27.38) en comparación con su grupo control para las tres regiones analizadas (CX, 66.60 ± 10.49 ; ST, 58.74 ± 20.63 ; HC, 67.38 ± 16.03) (Figura 14).

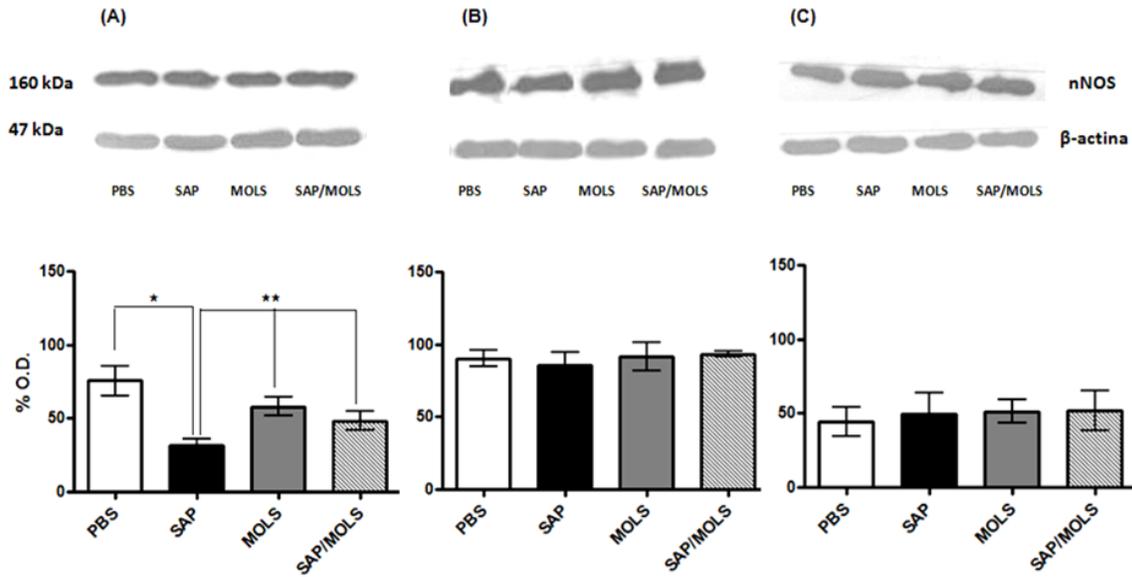


FIGURA 13. Cambios regionales en la expresión de la sintasa de la nNOS después de la administración de SAP y MOLS. (A) CX, (B) ST, (C) HC. Cada columna representa el porcentaje de densidad óptica promedio (%DO) \pm error estándar (n=5). En la parte superior de cada gráfica se muestran imágenes representativas obtenidas mediante Western blot.

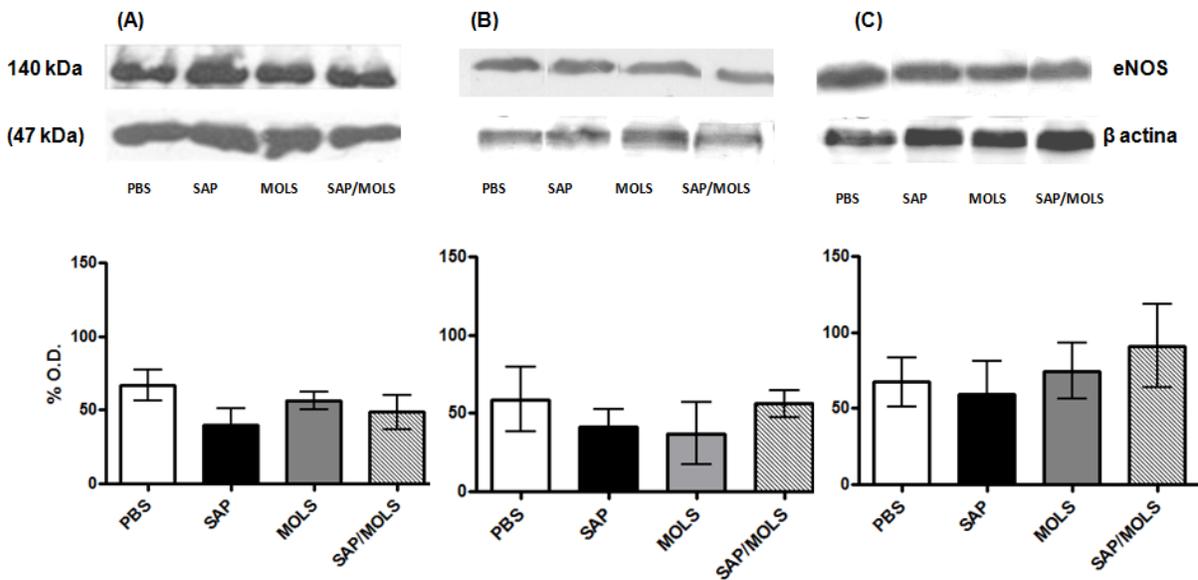


FIGURA 14. Cambios regionales de la expresión de la eNOS después de la administración de SAP y MOLS. (A) CX, (B) ST, (C) HC. Cada columna representa el porcentaje de densidad óptica promedio (%DO) \pm error estándar (n=5). En la parte superior de la gráfica se muestra la imagen representativa de la inmunodetección por Western blot.

7.5.3 EVALUACIÓN DE METABOLITOS DEL NO: NO₂⁻

Como se muestra en las siguientes tablas, la evaluación de los NO₂⁻ no mostró diferencias estadísticamente significativas de los niveles de nitritos entre los grupos experimentales ni entre las regiones cerebrales analizadas. Estos resultados podrían estar en correlación con el tiempo y la administración de una dosis única del MOLS (Tablas 5-7).

Tabla 5. Determinación de NO₂⁻ en CX

GRUPO	μmol/mg
PBS	0.31±0.06
SAP	0.26±0.04
MOLS	0.27±0.06
SAP+MOLS	0.38±0.81

Los valores corresponden al promedio ± error estándar de 8 experimentos independientes.

Tabla 6. Determinación de NO₂⁻ en ST

GRUPO	μmol/mg
PBS	0.15±0.03
SAP	0.17±0.03
MOLS	0.20±0.03
SAP+MOLS	0.32±0.07

Los valores corresponden al promedio ± error estándar de 8 experimentos independientes.

Tabla 7. Determinación de NO₂- en HC

GRUPO	μmol/mg
PBS	0.11±0.04
SAP	0.08±0.01
MOLS	0.11±0.02
SAP+MOLS	0.08±0.02

Los valores corresponden al promedio ± error estándar de 8 experimentos independientes.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron los parámetros celulares y bioquímicos, mediante los cuales el MOLS promueve la recuperación cognitiva en el modelo de denervación colinérgica asociada a la administración de la SAP. Los resultados obtenidos en este estudio, constituyen la primera evidencia experimental en este modelo, que demuestra el efecto modulador del MOLS sobre el sistema nitrérgico cortical y su correlación con el aprendizaje y la memoria de reconocimiento.

8.1 Efecto del donador de NO MOLS sobre la recuperación cognitiva en el modelo experimental de denervación colinérgica inducido por SAP.

8.1.1 Facilitación del aprendizaje

Numerosas evidencias muestran la participación del NO en la recuperación de la memoria de reconocimiento en roedores. La PRO es una prueba ampliamente utilizada para evaluar el efecto del MOLS sobre el déficit cognitivo inducido por ESC. Esta prueba permite evaluar algunos aspectos de la demencia de Alzheimer, como las alteraciones de la memoria episódica en modelos animales, (Dere y cols., 2007; Pitsikas y cols., 2005; 2002; 2001). Basándonos en lo anterior, se consideró de interés evaluar a través de la PRO, el efecto del NO sobre la recuperación cognitiva en el modelo de denervación colinérgica inducido por SAP.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la administración de SAP, disminuyó la exploración del objeto novedoso durante la fase de elección de la PRO, posterior a un intervalo de retraso de 15 minutos, lo que se reflejó en un menor índice de discriminación en comparación con el control. El aspecto más relevante de este análisis fue que MOLS inyectado 40 minutos previos a la realización de la etapa de muestra y 60 minutos antes de la elección, permitió recuperar la memoria de reconocimiento e incrementar la conducta exploratoria hacia el objeto novedoso.

La información obtenida en este estudio podría explicarse con base a la acción de los donadores de NO en la liberación de ACh en diferentes regiones cerebrales. Es conocido que el NO generado a través de compuestos donadores, favorece la adquisición, el almacenamiento, la recuperación de la información del objeto familiar y la discriminación del objeto novedoso (Boulatakis y cols., 2010). Tomando en cuenta, que la disminución de la transmisión colinérgica, posterior a la infusión de la SAP en núcleos colinérgicos del CBA, tiene un efecto negativo en el mantenimiento de la memoria a corto plazo del objeto explorado (Bermúdez-Rattoni y cols., 2009; Sambeth y cols., 2007; Abe y cols., 2004) y que el efecto de MOLS antes de la adquisición es comparable con lo demostrado por Boulatakis y cols., (2010), se podría considerar que el NO liberado por MOLS, activa la liberación de ACh en terminales sinápticas provenientes del SM, modulando así el aprendizaje y la consolidación de la información referente al objeto explorado durante la fase de muestra.

La discriminación del objeto novedoso en la PRO, depende de la inervación colinérgica proveniente del CBA (Boulatakis y Pitsikas; Pichat, 2007; Kim y cols., 2003; Koylu y cols., 2005). Prueba de ello son los hallazgos de los grupos de Pickaerts (2005) y Sambet (2007), quienes demostraron que el incremento en la liberación de la ACh a través del uso de inhibidores de la esterasa de acetilcolina (AChE), como el metrifonato y el donepezilo, administrados antes de la fase de muestra, aumentan la memoria de reconocimiento posterior a un retraso de 24 horas.

8.2 Efecto del NO en la recuperación del daño celular del *septum* medial inducido por SAP.

8.2.1 Posibles mecanismos neuroprotectores del MOLS en el sitio de lesión (SM)

Dentro de las características neuropatológicas demostradas en estudios *post mortem* de pacientes con demencia de Alzheimer, se encuentra la degeneración de las neuronas colinérgicas del CBA (Quinlivan y cols., 2007). Acorde con estos hallazgos está demostrado que el efecto de la administración intraventricular de dosis elevadas de la SAP (5 µg/7 µl) o de su inyección en núcleos colinérgicos del CBA, está asociado a la pérdida celular en el sitio de lesión y la consecuente denervación a las regiones blanco, por lo que la disminución de las neuronas septales depende de la dosis de inmunotoxina administrada y se relaciona con déficits en diferentes pruebas cognitivas (Frechette y cols., 2009; 2008; Harrell, 2005; Márques-Pereira y cols., 2005; Gallani y cols., 2002; Browne y cols., 2001; Ferreira y cols., 2001; Kolasa y Harrell, 2000; Leanza y cols., 1998). En el presente trabajo, se consideró fundamental llevar a cabo la técnica histológica de Nissl en cortes coronales de SM, con la finalidad de identificar alteraciones morfológicas y posibles cambios en la población de neuronas septales, asociados a la inyección de la inmunotoxina SAP. Así como dilucidar si el efecto del NO podría estar orientado a evitar el daño neuronal inducido por SAP. Los resultados derivados del análisis histológico mostraron de manera cualitativa, que las neuronas expuestas a SAP exhiben alteraciones morfológicas como son núcleos oscuros y encogimiento celular. Los cambios morfológicos observados, podrían estar asociados con la disminución de la población celular (49%). Por lo que se comprobó la susceptibilidad de las células colinérgicas septales a la inmunotoxina (Harrell y cols., 2005).

Respecto a la participación del donador del NO (MOLS) en la sobrevivencia neuronal en el sitio de lesión, se argumenta que MOLS evitó la progresión del daño celular en las neuronas septales sobrevivientes. Por lo que es factible proponer que la dosis de SAP

utilizada (0.22 µg/µl) ocasiona un daño celular reversible y que el NO podría ejercer un efecto protector en las células del SM.

En la literatura se reporta que el NO incrementa la expresión génica de elementos cito protectores como proteínas de la familia Bcl-2, la proteína de choque térmico 70 (HSP70) o la hemo oxigenasa (Kang y cols., 2004). Aunque es poco probable que la dosis única y el tiempo de administración del MOLS (60 minutos previos a la realización de los ensayos), generen procesos transcripcionales, se podría sugerir que el NO liberado por el donador MOLS genera modificaciones postraduccionales que evitan la muerte celular. Está demostrado que el NO producido por el donador S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) ocasiona la S-nitrosilación de residuos catalíticos de cisteína e inhibe la actividad de las caspasas 8 y 9, que son iniciadoras de la apoptosis; también evita la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF-κβ (Li y Wogan, 2005; Reynaert, 2004; Kim y cols., 2000).

Aunque en este estudio no se presenta evidencia experimental que permita explicar detalladamente el mecanismo de muerte neuronal asociado a SAP, algunos autores reportan que una de estas causas es el incremento tanto de la expresión del receptor de baja afinidad para NTF p75 (p75-R) como de su molécula blanco, el precursor del NGF (proNGF) (Webster y Pirrung, 2007; Winkler y cols., 2000). Al respecto, está demostrado que en ausencia de NGF, los donadores de NO como MOLS, inhiben la apoptosis mediada por el receptor p75, a través de la fosforilación de TrkA y a través de la activación de la vía PI₃-K/Akt y ERK1/2 (Akassoglou, 2005; Culmsee, 2005; Napoli e Ignarro, 2003).

Otro mecanismo adicional de sobrevivencia neuronal mediada por NO, demostrado *in vitro* a través de la administración de MOLS en cultivos de células PC12, es la recuperación del potencial de membrana mitocondrial (reducción de la liberación de

citocromo c), la inhibición de la caspasa 3 y la reducción del daño nuclear. (Lee y cols., 2005).

8.3 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE ChAT

La alteración de la funcionalidad colinérgica, debida a la disminución de la población neuronal en el SM inducida por la SAP, se relaciona con decremento de la actividad y expresión de los marcadores colinérgicos ChAT, AChE y del transportador de alta afinidad de colina en el CBA, y en las regiones blanco invadidas por éste (Craig y cols., 2009; Wrenn y Wiley, 1998).

En el presente trabajo se evaluó, de manera indirecta, la funcionalidad colinérgica en el SM a través del inmunomarcaje contra la ChAT, de modo similar a lo demostrado por Hartlage-Rübsamen y Schliebs (2001a). Los resultados obtenidos demostraron que SAP disminuyó el 41% de las células colinérgicas septales. La disminución de células positivas a ChAT es un proceso gradual que puede verificarse desde su inicio, a partir del día 3 posterior a la lesión, donde la pérdida de neuronas colinérgicas es de manera prácticamente total a los 7 días después de la inyección de la inmunotoxina (Hartlage-Rübsamen y Schliebs, 2001b). La disminución parcial de la población neuronal, permitió evaluar el efecto del NO en la recuperación de las neuronas colinérgicas residuales y su correlación con el progreso en el desempeño de las ratas durante la prueba cognitiva. De acuerdo con lo esperado, la administración de MOLS no tuvo efecto en la recuperación poblacional. En conjunto, estos resultados apoyan la propuesta de que existe una correlación entre la no discriminación del objeto novedoso por los animales inyectados con SAP y la pérdida de las neuronas colinérgicas en el sitio de lesión. También es factible sugerir que existe una asociación entre la recuperación cognitiva de los animales del grupo SAP+MOLS y el efecto del NO en el rescate de la funcionalidad colinérgica de

las neuronas residuales. La detección de cambios en los niveles de ChAT en regiones inervadas por el SM, podría sustentar esta propuesta.

Como está reportado previamente, la sobrevivencia y el mantenimiento del fenotipo de las neuronas colinérgicas del CBA depende mayormente de la interacción entre NGF y el receptor TrkA (TrkA-R), así como de la activación de la vía de señalización regulada por la cinasa 3' de fosfatidilinositol (IP₃K), Akt y NO (Ou y cols., 2010; Madziar y cols., 2008). Considerando que la administración *in situ* de donadores de NO promueven la expresión de ChAT, es viable sugerir que MOLS podría modular la funcionalidad colinérgica septo medial, mediante el incremento de la liberación de ACh por las neuronas sobrevivientes (Prast y Philippu, 2001). Aunado a lo anterior, otras evidencias experimentales muestran que el efecto del NO liberado por donadores involucra la activación de la enzima guanilato ciclasa (GC), el incremento del segundo mensajero GMPc y la entrada de Ca²⁺ a la célula (Tjong y cols., 2007; Centelles y cols., 2004). Estos eventos promueven a su vez la activación de las proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺: proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa II dependiente de Ca²⁺/Calmodulina (CaM-cinasa), las cuales son responsables de fosforilar e incrementar la actividad de ChAT en las terminales sinápticas corticales e hipocampales (Dobransky y Rylett, 2005; Kaytor y Orr, 2002).

8.4 EVALUACIÓN DEL SISTEMA NITRÉRGICO EN DIFERENTES REGIONES CEREBRALES

8.4.1 Recuperación de la actividad de cNOS

Con la finalidad de determinar el efecto del MOLS en la modulación de la funcionalidad nitrérgica posterior a la denervación colinérgica inducida por la SAP, se cuantificó la actividad de la cNOS en el HC, que es la región blanco del SM y también en las regiones de la CX y ST.

Es importante destacar que de acuerdo con lo esperado, la dosis única de MOLS (4 mg/kg) administrada 7 días posteriores a la inyección de SAP y 60 minutos antes de la evaluación de la actividad enzimática, fue capaz de recuperar la actividad basal de la cNOS en las regiones de la CX y el ST.

Contrario a lo reportado con respecto a la reducción de la actividad catalítica y de unión a sustrato de la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) por la inyección de SAP en el HC, los resultados obtenidos del análisis de la actividad de la cNOS hipocampal no indicaron cambios posteriores a la administración de SAP, lo que podría estar en función de la administración de una dosis menor de inmunotoxina (0.22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Sin embargo, sí se observó incremento de la actividad de la cNOS posterior a la administración del MOLS. Estos datos aluden la participación de vías no colinérgicas que mantienen la producción basal de NO en el HC como lo es el sistema glutamatérgico, cuya activación podría explicar el incremento de la actividad de la cNOS en esta región (He y cols., 2001). Este efecto modulador del MOLS sobre la actividad de la cNOS cortical y estriatal, podría ser el mecanismo bioquímico asociado a la mejora del desempeño durante la fase de elección (PRO) de los animales lesionados con la SAP. En conjunto, estos resultados permiten sugerir que la exploración de la novedad puede ser modulada por diferentes regiones cerebrales. La prueba de memoria de ubicación de objetos, es un paradigma que demuestra la participación directa del HC en la formación de la memoria de reconocimiento asociada a un contexto espacial (Broadbent y cols., 2010).

Como ya fue mencionado previamente, un factor importante en la señalización mediada por el NO, tanto endógeno como el proporcionado por los compuestos donadores, es la activación de la GC y la presencia del GMPc, cuyos niveles se relacionan directamente con la actividad de la NOS constitutiva (Estévez y cols., 2002; Moncada y cols., 1991). Sin embargo, también existen otros mecanismos involucrados en la modulación del sistema nitrérgico por el NO exógeno. Varios autores explican que la inhibición de

distintas fosfodiesterasas (PDE5; sildenafil, zaprinast, vardenafil; PDE2, 5, 10: papaverina), incrementa los niveles de GMPc en células corticales, lo que se relaciona a su vez con el aumento de la actividad de la NOS en CX, ST e HC. Estos eventos favorecen el aprendizaje y la consolidación de la información durante la prueba de reconocimiento de objetos, en ratas y ratones expuestos a los donadores de NO, nitroprusiato de sodio (SNP) y dietilamino-NONOato (DEANO) (De Vente, 2008; Domeck-Lopacińska y Strosznajder, 2008; Rutten y cols., 2005, 2007; Prickaerts, 2002). Estas evidencias indican que la vía NO/GC/GMPc participa en la transmisión colinérgica del CBA y sus regiones blanco (De Vente, 2008). Con base en lo anterior, en este estudio se sugiere que el suministro exógeno de NO por el MOLS podría modular la actividad de la PDE5 a través de la estimulación de la GC y del incremento del GMPc en el espacio sináptico (van Donkelaar, 2008; Fitzgerald y cols., 2005). A su vez, la activación e incremento de GC/GMPc son eventos que promueven la liberación de ACh por las terminales colinérgicas provenientes de las neuronas septales sobrevivientes, el incremento del Ca^{2+} intracelular a través de receptores NMDA, la activación de la cNOS y la regulación de la producción del NO endógeno (Harooni, 2009; De Vente, 2008; Hopper y cols., 2006; Culmsee y cols., 2005; Gerova y Kristek, 2005).

Es importante mencionar que la disminución de la actividad catalítica de la cNOS en la CX y el ST, generada por la administración de SAP, podría deberse a disminución en la síntesis y liberación de ACh en estas regiones. La dosis única del MOLS y el esquema de administración utilizado (60 minutos antes de la extracción de las regiones de la CX, ST e HC), sugieren el incremento de ACh como un mecanismo que favorece el proceso de aprendizaje y contribuye a la formación de una memoria de corto plazo (Rutten y cols., 2007).

8.4.2 Efecto del MOLS en la expresión de eNOS y nNOS

Está demostrado que la administración intraventricular de la SAP disminuye la expresión de la nNOS en núcleos colinérgicos (Hartlage-Rübsamen y Schliebs, 2001a). Con el propósito de evaluar una posible asociación entre la expresión de las isoformas neuronal y endotelial de la NOS con la actividad de la cNOS, se analizaron los niveles de nNOS y eNOS mediante *Western blot* en el HC, CX y ST.

Los resultados obtenidos mostraron que no hay cambios aparentes en la expresión de la nNOS en la región colinoceptiva del HC y en el ST, posterior a la inyección de SAP. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hartlage-Rübsamen y Schliebs (2001a) en un modelo de denervación colinérgica. No obstante que la actividad enzimática no siempre se relaciona directamente con su expresión, la SAP causó en la CX una disminución, estadísticamente significativa, de los niveles de la nNOS con respecto a su control, lo que podría explicar a su vez la disminución de la actividad de la cNOS cortical. El dato más notable de este análisis fue que la administración de MOLS incrementó significativamente los niveles de la nNOS en la CX, posterior a la denervación colinérgica inducida por SAP. Sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo con respecto al control. Estos datos sugieren que la regulación de la expresión de la nNOS cortical involucra la participación directa del sistema colinérgico proveniente del CBA. El efecto del MOLS sobre la alteración de la transmisión colinérgica después de la lesión con SAP, podría estar asociado a mecanismos compensatorios endógenos que mantienen los niveles de la nNOS. Al respecto, Ihara y cols., (2006) demostraron la existencia de una variante membranal de la nNOS (nNOS- μ), que es el producto de un proceso de *splicing alternativo* y su presencia constituye el 10.3% del nivel total de la nNOS en la CX y en otras regiones cerebrales como el HC y el ST. También existe otra variante menor localizada en el citosol, la nNOS- β (Park y cols., 2000). Considerando que el incremento de los niveles de la nNOS en la CX por el MOLS no fue estadísticamente diferente al

control, es plausible proponer que el NO proporcionado de manera exógena puede regular la expresión de estas especies menores de la nNOS (Bonaventura y cols., 2008).

La disminución de la expresión de la nNOS en CX y la ausencia de cambios de los niveles de la proteína en el HC, podrían explicarse en función de la profundidad de la inyección de la SAP. Como se indicó anteriormente, la administración estereotáxica se realizó de acuerdo con la coordenada ventral -7.5 (con respecto a la duramadre), la cual se encuentra cerca del limbo vertical de la banda diagonal de Broca, que es el núcleo colinérgico que inerva a la neocorteza.

No obstante que el sistema colinérgico proveniente del CBA juega un papel importante en la vasodilatación de la corteza cerebral, la lesión colinérgica derivada de la inyección de la SAP, no reveló cambios en los niveles de la eNOS en la CX, ST y HC para los diferentes tratamientos en comparación con su grupo control. Estos resultados en conjunto, se pueden explicar a través de la participación de vías compensatorias colinérgicas y no colinérgicas, que mantienen los niveles de la NOS en las regiones analizadas.

La regulación de los niveles de la eNOS cortical se lleva a cabo a través de la activación de receptores nicotínicos y por la liberación de NO, ya que está demostrada la existencia de neuronas nitrérgicas en la CX, localizadas cerca de los vasos sanguíneos, las cuáles reciben inervación del CBA y expresan receptores nicotínicos (El-Mas y cols, 2011).

Sin embargo, existen otros recursos de NO, la glía cortical que es NOS positiva y también algunos astrocitos cercanos a los vasos sanguíneos los cuales también reciben inervación colinérgica del CBA (De la Monte y cols., 2000; Lüth y cols., 2001). Otro mecanismo colinérgico involucrado, se refiere a la activación de receptores muscarínicos como un posible mecanismo de autorregulación para mantener el flujo sanguíneo cortical y evitar la disminución de la expresión de la eNOS por SAP (Goryacheva y cols., 2010; Uchida y Hotta, 2009).

Un efecto compensatorio no colinérgico que podría relacionarse a la administración de MOLS para incrementar los niveles corticales de la eNOS, es la modulación de la expresión y activación de la hemo-oxigenasa 1 por el NO exógeno (Pae y cols., 2010; Jiang y cols., 2006).

8.4.3 Evaluación de metabolitos del NO: NO_2^-

Con el propósito de evaluar el efecto modulador del MOLS sobre la producción del NO endógeno posterior a la denervación colinérgica por SAP, se llevó a cabo la determinación cuantitativa de los niveles de NO_2^- en CX, ST e HC. El incremento de los niveles de NO_2^- posterior a la administración de compuestos donadores está ampliamente demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Sjakste y cols., 2007). Sin embargo, contrario a lo descrito, los resultados obtenidos en la presente investigación no mostraron diferencias estadísticamente significativas de los niveles de NO_2^- entre los grupos experimentales con respecto a su control, ni entre las regiones cerebrales analizadas. La ausencia de cambios en los niveles de NO_2^- en el HC, CX y ST sugiere la participación de vías alternas de generación de NO en estas regiones. La formación de compuestos nitrosilados es un mecanismo endógeno que funciona como un reservorio de NO, tal es el caso de la generación del S-nitroso-glutatión (GSNO), derivado de la nitrosilación del glutatión reducido (GSH). Es así que el NO puede ser liberado a partir del GSNO por diversas enzimas como la GSH peroxidasa, tioredoxina reductasa y la γ -glutamil transpeptidasa y posteriormente ser oxidado a NO_2^- (Guix, 2005; Fas y cols., 2004; Akhter y cols., 2003). Adicionalmente, está reportado que la unión del NO al grupo *hemo* y la formación de la S-nitrosohemoglobina también promueve la formación de NO_2^- en el plasma y su liberación en diferentes regiones cerebrales (Hernández y Hare, 2011; Vanin, 2009). Estas evidencias en conjunto, apoyan la ausencia de cambios en los niveles de NO_2^- en las

diferentes regiones analizadas para todos los grupos experimentales incluyendo su control.

9. RESUMEN DE LOS RESULTADOS

- La administración de la SAP no causó cambios en el desempeño motriz en los animales experimentales, así como tampoco la administración de MOLS generó cambios en la actividad motora.
- La administración intraseptal de la SAP disminuyó la exploración del objeto novedoso en la fase de elección de la PRO.
- La administración de una dosis única de MOLS (4 mg/kg) 60 minutos antes de la fase de muestra tuvo un efecto modulador en el aprendizaje y facilitó la memoria de reconocimiento.
- La administración de la SAP en el SM disminuyó el 41% de la población de células colinérgicas en el sitio de lesión.
- MOLS no tuvo efecto sobre la recuperación de la población celular colinérgica en el sitio de la lesión. Sin embargo, este donador de NO tuvo un efecto protector, ya que evitó la progresión de las alteraciones morfológicas en las células septales sobrevivientes.
- SAP disminuyó significativamente la actividad de la cNOS en la CX y ST en comparación con el grupo control (PBS).
- MOLS tiene un papel importante como modulador de la actividad de la cNOS en CX y ST, así como en la expresión de la nNOS cortical.

- La dosis administrada de SAP (0.22 µg/µl) no produjo cambios en los niveles de nitritos en CX, ST e HC de los animales tratados con SAP y MOLS.

10. PROPUESTA DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE MOLS

Con base en los resultados descritos en el presente trabajo y aunado a lo reportado en la literatura, es factible proponer que el NO liberado por MOLS dirige su acción hacia tres vías principales en el modelo de denervación colinérgica inducido por SAP (ver Figura 15).

1. Al equilibrio de los niveles de NGF maduro con respecto a su precursor pro-NGF.
2. A la recuperación cognitiva y de la funcionalidad colinérgica a través de la activación de la ChAT y la liberación de ACh en terminales sinápticas, ambos eventos mediados por NGF. El efecto modulador de MOLS sobre el sistema nitrérgico también involucra el incremento en la expresión y actividad de la cNOS como consecuencia de la conservación de los niveles de neurotrofina madura y de NO, así como del incremento en la liberación de la ACh por el NO endógeno.
3. A la sobrevivencia de las células colinérgicas septales a través de la activación de la vía de señalización de IP₃k/Akt derivada de la regulación de la expresión de p75 y el incremento en la expresión de TrkA-R.

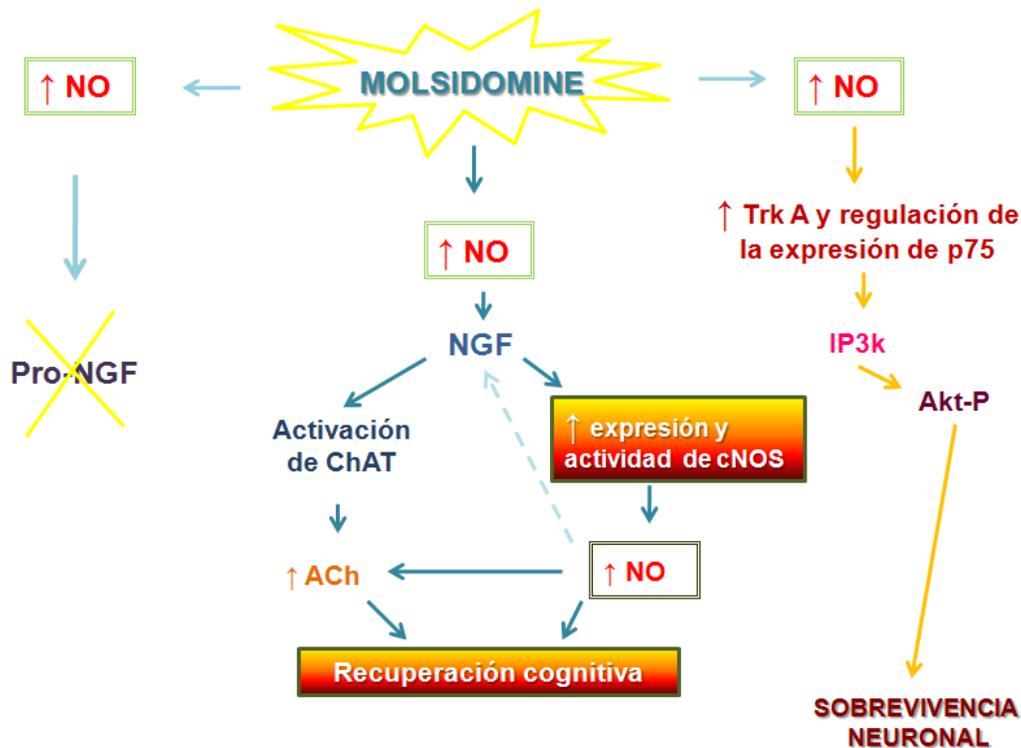


FIGURA 15. Mecanismo de acción del MOLS propuesto para la recuperación cognitiva y la supervivencia de las neuronas colinérgicas residuales del SM. Las evidencias experimentales descritas en esta investigación se muestran en los recuadros de color naranja.

11. CONCLUSIÓN

Con base a los resultados mostrados se concluye que SAP disminuyó la exploración del objeto novedoso en la prueba de reconocimiento de objetos, lo que podría estar asociado a la disminución de la población colinérgica en el sitio de lesión (SM). La administración de MOLS podría evitar la progresión del daño celular y favorecer así la recuperación de la actividad basal de la cNOS en la CX y ST, lo cual podría correlacionarse con la recuperación del déficit cognitivo generado por SAP. Estos resultados nos permiten sugerir que 1) MOLS ejerce un papel modulador del sistema nitrérgico y 2) promueve la recuperación cognitiva en el modelo de denervación colinérgica inducido por SAP.

12. BIBLIOGRAFÍA:

Abe, N., Fujii, T., Nishio, Y., Iizuka, O., Kanno, S., Kikuchi, H., Takagi, M., Hiraoka, K., Yamasaki, H., Choi, H., Hirayama, K., Shinohara, M., Mori, E. (2011). False item recognition in patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychol.* 49: 1897-1902.

Ainge, J. A., Heron-Maxwell, C., Theofilas, P., Wright, P., de Hoz, L., Wood, E. R. (2006). The Role of the hippocampus in object recognition in rats: Examination of the influence of tasks parameters and lesion size. *Behavioural Brain Research* 167: 183-195.

Akassoglou, K. (2005). Nerve growth factor-independent neuronal survival: a Role for NO donors. *Mol. Pharmacol.* 68: 952-955.

Akhter, S., Green, J.R., Root, P., Thatcher, G.J., Mutus, B. (2003). Peroxynitrite and NO donors form colored nitrite adducts with sinapinic acid: potential applications. *Nitric Oxide* 8: 214-221.

Alberch, J., Carman-Krzan, M., Fabrazzo, M., Wilse, B.C. (1991). Chronic treatment with scopolamine and physostigmine changes nerve growth factor (NGF) receptor density and NGF content in rat brain. *Brain Res.* 542: 233-240.

Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *J. Biochem.* 357: 593-615.

Áviles-Funes J.A., Gray-Donald K., Payette H. (2006). Medición de las capacidades físicas de adultos mayores de Quebec: un análisis secundario del estudio NuAge. *Salud pública de México* 48 (6): 446-454.

Bagga, S., Seth, D., Batra, J.K. (2003). The cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein saporin-6 is attributed to its rRNA N-glycosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities. *J. Biol. Chem.* 278 (7): 4813-4820.

Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1154: 237-282.

Barbieri, L., Valbonesi, P., Govoni, M., Pession, A., Stirpe, F. (2000). Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on various forms of mammalian DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 1480: 258-266.

Bartus R.T., Dean R.L., Beer B., Lippa S.A. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science.* 217: 408-412.

Bartus, R.T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* 163: 495-529.

Bassant, M.H., Jouvenceau, A., Apartis, E., Poindessous-Jazat, F., Dutar, P., Billard, J.M. (1998). Immunolesion of the cholinergic basal forebrain: effects on functional properties of hippocampal and septal neurons. *Int. J. Devl. Neuroscience* 16(7/8): 613-632.

Baxter, M.G, Chiba, A. A. (1999). Cognitive functions of the basal forebrain. *Curr Opin Neurobiol* 9:178 –183.

Bermúdez-Rattoni F., Okuda S., Roozendaal B. and McGaugh J.L. (2009). Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. *Learn. Mem.* 12: 447-449.

Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P.Morimoto, R.I., Cohen, G.M., Green, D.R. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell. Biol.* 2: 469-475.

Bonaventura, D., Lunardi, C.N., Rodrigues, G.J., Neto, M.A., Bendhack, L.M. (2008). A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. *Nitric Oxide* 18: 287-295.

Boultadakis, A., Liakos, P., Pitsikas, N. (2010). The nitric oxide-releasing derivative of ferulic acid NCX2057 antagonized delay-dependent and scopolamine-induced performance deficits in a recognition memory task in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* 34: 5-9.

Bredt, D.S. (1999). Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Rad. Res.* 31: 577-596.

Bredt, D.S., Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *PNAS* 87: 682-685.

Broadbent, N.J., Gaskin, S., Squire, L.R., Clark, R.E. (2010). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn. Mem.* 17(1): 5-11.

Browne, S.E., Lin, L., Mattson, A., Georgievska, B., Isacson, O. (2001). Selective antibody-induced cholinergic cell and synapse loss produce sustained hippocampal and cortical hypometabolism with correlated cognitive deficits. *Exp. Neurol.* 170: 36-47.

Brookes, P.S., Salinas, E.P., Darley-USmar, K., Eiserich, J.P., Freeman, B.A., Darley-USmar, V.M., Anderson, P.G. (2000). Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 275: 20474-20479.

Bryan N.S. (2006). Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence?. A systems-based review. *Free Radic. Biol. Med.* 41: 691-701.

Buhot, M.C., Naili, S. (1995). Changes in exploratory activity following stimulation of hippocampal 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the rat. *HIPPOCAMPUS* 5: 198-208

Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D.A., Stella, A.M.G. (2007). Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev.* 8: 766-775.

Centelles, J.J., Esteban, C., Imperial, S. (2004). Óxido nítrico: un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *OFFARM* 23(11): 96-102.

Chang, Q., Gold, P.E. (2004). Impaired and spared cholinergic functions in the hippocampus after lesions of the medial septum/vertical limb of the diagonal band with 192 IgG-saporin. *HIPPOCAMPUS* 14:170–179.

Chen, M.J., Russo-Neustadt, A.A. (2007). Nitric oxide signaling participates in norepinephrine-induced activity of neuronal intracellular survival pathways. *Life Sci.* 81(16): 1280-1290.)

Contestabile, A. (2008). Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural derived tumor cells. *Prog. Neurobiol.* 84: 317-328.

Contestabile, A., Ciani, E. (2004). Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem. Int.* 45: 903-914.

Corkin, N.S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.?. *Nat. Rev. Neurosci.* 395: 272-274.

Craig, L.A., Hong, N.S., Kopp, J., McDonald, R.J. (2009). Selective lesion of medial septal cholinergic neurons followed by a mini-stroke impairs spatial learnings in rats. *Exp. Brain Res.* 193: 29-42.

Cuello, A.C., Bruno, M.A., Allard, S., Leon, W., Iulita, F. (2010). Cholinergic involvement in Alzheimer's disease. A link with NGF maturation and degradation. *J. Mol. Neurosci.* 40: 230-235.

Culmsee, C. Gerling, N., Landshamer, Rickerts, B., Duchstein, H.J., Umezawa, K., Klumpp, S., Kriegstein.J. (2005). Nitric oxide donors induce neurotrophin-like survival signaling and protect neurons against apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 68(4): 1006-1017.

Da Cunha, I.C., Jose, R.F., Orlandi-Pereira, L., Pimenta, J.A., Oliveira de Souza, I.A., Reiser, R., et al. (2005). The Role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus-maze. *Physiol. Behav.* 84(3):351-358.

De la Monte, S.M., Lu, B.X., Sohn, Y.K., Etienne, D., Kraft, J., Ganju, N., Wands, J.R. (2000). Aberrant expression of nitric oxide synthase III in Alzheimer's disease: relevance to cerebral vasculopathy and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 21: 309-319.

De Vente, J., Abildayeva, K., Van de Waarenburg, M., Markerink-van Ittersum, M., Steinbusch, H.W.M., Mulder, M. (2008). NO-mediated cGMP synthesis in cultured cholinergic neurons from the basal forebrain of the fetal rat. *Brain Res.* 1217: 25-36.

Deiana, S., Platt, B., Riedel, G. (2011). The cholinergic system and spatial learning. *Behav. Brain Res.* 221: 389-341.

Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci. and Biobehav. Rev.* 31: 673-704.

Détari, L., Rasmusson, D.D., Semba, K. (1999). The Role of basal forebrain neurons in tonic and phasic activation of the cerebral cortex. *Prog. Neurobiol.* 58: 249-277.

- Dinerman, J.L., Steiner, J.P., Dawson, T.M., Dawson, V., Snyder, S.H. (1994). Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacol.* 33(11): 1245-1251.
- Dobransky, T., Rylett, R.J. (2005). A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. *J. Neurochem.* 95: 305-313.
- Domek-Lopacińska, K., Strosznajder, J.B. (2008). The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Res.* 1216: 68-77.
- Domek-Lopacinska, K., Strosznajder, J.B. (2005). Cyclic GMP metabolism and its Role in brain physiology. *J. Physiol. Pharmacol.* 56 (suppl. 2): 15-34.
- Doyle, C., Holscher, C., Rowan, M.J., Anwyl, R. (1996). The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitroindazole blocks both long-term potentiation and depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. *J. Neurosci.* 16:418-424.
- Driscoll, I., Hamilton, D.A., Petropoulos, H., Yeo, R.A., Brooks, W.M., Baumgartner, R.N., Sutherland, R.J. (2003). The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cerebral Cortex* 13:1344–1351.
- Dudchenko P.A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28: 699-709.
- Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus. *Neuron* 44(1):109-20.
- Eisenach, J.C. (1997). Update on spinal cord pharmacology in pain. *Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.* 110: 124-126.
- El-Mas, M.M., El-Gowilly, S.M., Gohar, E.Y., Ghazal, A.R.M., Abdel-Rahman, A.A. (2011). Estrogen dependence of the renal vasodilatory effect of nicotine in rats: Role of α_7 nicotinic cholinergic receptor/eNOS signaling. *Life Sci.*8(3-4): 187-193.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav. Brain Res.* 215: 244-254.
- Ennaceur, A., Michalikova, S., Bradford, A., Ahmed, S. (2005). Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav. Brain Res* 159(2): 247-266.
- Epa, W.R., Markovska, K., Barrett ,G.L. (2004). The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation. *J. Neurochem.* 89(2): 344-353.
- Estévez, A.G., Kamaid, A.D, Thompson, J.A., Cornwell, T.L., Radi, R., Barbeito, L., Beckman, J.S. (2002). Cyclic guanosine 5' monophosphate (GMP) prevents expression of neuronal nitric oxide synthase and apoptosis in motor neurons deprived of trophic factors in rats. *Neurosci. Lett.* 326: 201-205.

- Fagni, L. and Bockaert, J. (1996). Effects of nitric oxide on glutamate-gated channels and other ionic channels. *J. Chem. Neuroanat.* 10: 231-240.
- Fas, U., Panickar, K., Williams, K., Nevels, K., Personett, D., McKinney, M. (2004). The Role of glutathione in nitric oxide donor toxicity to SN56 cholinergic neuron-like cells. *Brain Res.* 1005: 90-100.
- Feelisch, M.; Ostrowski, J.; Noack, E. (1989). On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14(suppl.11):S13-S22.
- Ferreira, G., Meurisse, M., Gervais, R., Ravel, N., Lévy, F. (2001). Extensive immunolesions of basal forebrain cholinergic system impair offspring recognition in sheep. *Neurosci.* 106(1): 103-115.
- Figuroa, S., López, E., Arce, C., Oset-Gasque, M.J., González, M.P. (2005). SNAP, a NO donor, induces cellular protection only when cortical neurons are submitted to some aggression process. *Brain Res.* 1034: 24-33.
- Fin, C., Cunha, C.A., Bromberg, E., Schmitz, P.K., Bianchin, M., Medina, J.H., et al. (1995). Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63:113-115.
- Fitz N.F., Gibbs R.B., Johnson D. A. (2006). Aversive stimulus attenuates impairment of acquisition in a delayed match to position T-maze task caused by a selective lesion of septo-hippocampal cholinergic projections. *Brain Research Bulletin* 69: 660–665.
- Fitzgerald R.S., Shirahata, M., Chang, I. (2005). The effect of a nitric oxide donor, sodium nitroprusside, on the release of acetylcholine from the in vitro cat carotid body. *Neurosci. Lett.* 385: 148-152.
- Flesher, M.M., Butt, A.E., Kinney-Hurd, B.L. (2011). Differential acetylcholine release in the prefrontal cortex and hippocampus during pavlovian trace and delay conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96(2): 181-191.
- Fréchette, M., Rennie, K., Pappas, B.A. (2009). Developmental forebrain cholinergic lesion and environmental enrichment: behaviour, CA1 cytoarchitecture and neurogenesis. *Brain Res.* 1252: 172-182.
- Friedman, W.J. (2010). Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis. *Neuroscientist* 16(3): 244-252.
- Gallani, R., Jeltsch, H., Lehmann, O., Bertrand, F., Cassel, J.C. (2002). Effects of 192 IgG-saporin on acetylcholinesterase histochemistry in male and female rats. *Brain Res. Bull.* 58(2): 179-186.
- Garthwaite, G., Goodwin, D.A, Neale, S., Riddall, D., Garthwaite, J. (2002). Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 protects white matter axons from nitric oxide toxicity and metabolic stress, probably through Na⁺ channel inhibition. *Mol. Pharmacol.* 61: 97–104.

Gerová, M., Kristek, F. (2001). Efficiency of NO donors in substituting impaired endogenous NO production: a functional and morphological study. *Physiol. Res.* 50: 165-173.

Goryacheva, A.V., Kruglov, S.V., Pshennikova, M.G., Smirin, B.V., Malyshev, I.Y., Barskov, I.V., Viktorov, I.V., Downey, H.F., Manukhina, E.B. (2010). Adaption to intermittent hypoxia restricts nitric oxide overproduction and prevents beta-amyloid toxicity in rat brain. *Nitric Oxide* 23: 289-299.

Gridley, M.F. (1953). Manual of histology and special staining techniques. 2nd ed. McGraw Hill, New York.

Gu, C., Casaccia-Bonnel, P., Srinivasan, A., Chao, M.V., (1999). Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J.Neurosci.* 19: 3043–3049.

Guix, F.X., Uribealago, I., Coma, M., Muñoz, F.J. (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 76: 126-152.

Hall, C.N., Garthwaite, J. (2009). What is the real physiological NO concentration in vivo?. *Nitric Oxide* 21: 92-103.

Harati, H., Barbelivien, A., Cosquer, B., Majchrzak, M, Cassel, J.C. (2008). Selective cholinergic lesions in the rat nucleus basalis magnocellularis with limited damage in the medial septum specifically alter attention performance in the five-choice serial reaction time task. *Neurosci.* 153: 72-83.

Harooni, H.E., Naghdi, N., Sepehri, H., Rohani, A.H. (2009). The Role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short- and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adults rats. *Behav. Brain Res.* 201(1): 166-172.

Hartlage-Rübsamen, M., Schliebs, R. (2001). Rat basal forebrain cholinergic lesion affects neuronal nitric oxide synthase activity in hippocampal and neocortical target regions. *Brain Res.* 889(12-2): 155-164.

Hartlage-Rübsamen, M., Schliebs, R. (2001b). Sequential upregulation of cell adhesion molecules in degenerating rat basal forebrain cholinergic neurons and in phagocytic microglial cells. *Brain Res.* 897: 20-26.

Harrell, L.E., Parsons, D.S., Kolasa, K. (2001). Hippocampal sympathetic ingrowth occurs following 192 IgG-saporin administration. *Brain Res.* 911: 158-162.

Harrell, L.E., Parsons, D.S., Kolasa, K. (2005). PRO- and anti-apoptotic evidence for cholinergic denervation and hippocampal sympathetic ingrowth in rat dorsal hippocampus. *Exp. Neurol.* 194: 182-190.

He J., Yamada, K., Zou, L.B., Nabeshima, T. (2001). Spatial memory deficit and neurodegeneration induced by the direct injection of okadaic acid into the hippocampus in rats. *J. Neural Transm.* 108: 1435–1443.

- Heinecke, J., Ford, P.C. (2010). Mechanistic studies of nitrite reactions with metalloproteins and models relevant to mammalian physiology. *Coord. Chem. Rev.* 254: 235-247.
- Hempstead, B.L. (2002). The many faces of p75. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12(3): 260-267.
- Henderson, Z. (1996). Responses of basal forebrain cholinergic neurons to damage in the adult brain. *Prog. Neurobiol.* 48: 219-254
- Herchuelz, A., Carreer-Bruhwyler, F., Crommen, J., Chiap, P., Hubert, P., Messin, R., Dubois, C., Famaey, J.P., Géczy. (2004). Clinical pharmacokinetics of once-daily molsidomine. *Am. J. Drug Deliv.* 2(2): 131-141.
- Herman, J.P., Tasker, J.G., Ziegler, D.R., Cullinan, W.E. (2002). Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: Glutamate-GABA connections. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71(3):457– 468.
- Hernández-Schulman, I., Hare, J.M. (2011). Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* (PMID 21536106).
- Herremans, A.H.J., Hijzen, T.H., Welborn, P.F.E., Olivier, B., Slangen, J.L. (1996). Effects of infusion of cholinergic drugs into the prefrontal cortex area on delayed matching to position performance in the rat. *Brain Res.* 711: 102-111.
- Hess, D. T., 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.
- Heymach Jr., J.V., Muzyczka, N., Meyer, E.M. (1999). Long-term actions of vector-derived nerve growth factor or brain-derived neurotrophic factor on choline acetyltransferase and TRK receptors levels in the adult rat basal forebrain. *Neurosci.* 90(3): 815-821.
- Hodges, H. (1996). Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cogn. Brain Res.* 3 (3-4): 167-181
- Holtzman, D.M., Kilbridge, J., Bredt, D.S., Black, S.M., Li, Y., Clary, D.O., Reichardt, L.F., Mobley, W.C. (1994). NOS induction by NGF in basal forebrain cholinergic neurons: evidence for regulation of brain NOS by a neurotrophin. *Neurobiol. Dis.* 1: 51-60
- Hopper, R.A., Garthwaite, J. (2006). Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 26 (45): 11513-11521.
- Hudak, K.A., Wang, P., Tumer, N.E. (2000). A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: Depurination of the capped RNA template. *RNA* 6: 369-380.
- Ignarro, L.J., Napoli, C., Loscalzo, J. (2002). Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. An overview. *Circ. Res.* 90: 21-28.
- Ihara, H., Kuwamura, M., Atsuta, M., Nihonmatsu, I., Okada, T., Mukamoto, M., Kozaki. (2006). Expression of neuronal nitric oxide synthase variant, nNOS- μ , in rat brain. *Nitric Oxide* 15: 13-19.

- Janis, L.S., Glassier, M.M., Fulop, Z., Stein, D.G. (1998). Intraseptal injections of 192 IgG saporin produce deficits for strategy selection in spatial-memory tasks. *Behav. Brain Res.* 90 (1): 23-34.
- Jeltsch, H., Bertrand, F., Lazarus, C., and Cassel, J. C. (2001). Cognitive performances and locomotor activity following dentate granule cell damage in rats: Role of lesion extent and type of memory tested. *Neurobiol. Learn. Mem.* 76 (1): 81–105.
- Jiang, F., Roberts, S.J., Datla, S., Dusting, G.J. (2006). NO modulates NADPH oxidase function via heme oxygenase-1 in human endothelial cells. *Hypertension* 48: 950-957.
- Joels, M., Karten, Y., Heslen, W., de Kloet, E.R. (1997). Corticosteroid effects on electrical properties of brain cells: Temporal aspects and Role of antigluocorticoids. *Psychoneuroendocrinol.* 22 (suppl. 1):S81–S86.
- Kang, Y.C., Kim, P.K., Choi, B.M., Chyng, H.T. Ha, K.S., Kwon, Y.G., Kim, Y.M. (2004). Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide. *In vivo* 18: 367-376.
- Kaplan, D.R., Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10: 381-391.
- Kaytor, M.D., Orr, H.T. (2002). The GSK3 β signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12(3): 275-278.
- Kavya, R., Saluja, R., Singh, S., Dikshit, M. (2006). Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric oxide* 15: 280-294.
- Kelly, R.A., Smith, T.W. (1996). Nitric oxide and nitrovasodilators: similarities, differences, and interactions. *Am. J. Cardiol.* 77: 2C-7C.
- Kenney, J. W. and Gould, T. J. (2008). Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Mol. Neurobiol.* 38(1): 101–121.
- Kevil, C.G., Kolluru, G.K., Pattillo, C.B., Giordano, T. (2011). Inorganic nitrite therapy: historical perspective and future directions. *Free Radic. Biol. Med.* 51(3): 576-593.
- Kilbinger, H. (1996). Modulation of acetylcholine release by nitric oxide. *Prog. Brain Res.* 109: 219-224.
- Kim, Y.M., Kim, T.H., Chung, H.T., Talanian, R.V., Yin, X.M., Billiar, T.R. (2000). Nitric oxide prevents tumor necrosis factor α -induced rat hepatocyte apoptosis by the interruption of mitochondrial apoptotic signaling through S-nitrosilation of caspase-8. *Hepatology* 32(4): 770-778.
- Kim, M.J., Chun, S.K., Kim, Y.B., Mook-Jung, I., Jung, M.W. (2003). Long-term potentiation in visual cortical projections to the medial prefrontal cortex of the rat. *Neurosci.* 120: 283-289.
- Klein, R.L., Muir, D., King, M.A., Peel, A.L., Zolotukhin, S., Möller, J.C., Krüttgen, A., Klinkenberg, I., Blokland, A. (2010). The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34: 1307-1350.

- Klinkenberg, I., Sambeth, A., Blokland, A. (2011). Acetylcholine and attention. *Behav. Brain Res.* 221: 430-442.
- Knowles, R.G., Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298: 249-258.
- Kolasa, K., Harrell, L.E. (2000). Apoptotic protein expression and activation of caspases is changed following cholinergic denervation and hippocampal sympathetic ingrowth in rat hippocampus. *Neurosci.* 101(3): 541-546.
- Kopf, S.R., Baratti, C.M. (1996). Enhancement of the post-training cholinergic tone antagonizes the impairment of retention induced by a nitric oxide synthase inhibitor in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 65: 207-212.
- Koylu, E.O., Kanit, L., Taskiran, D., Dagci, T., Balkan, B., Pogun, S. (2005). Effects of nitric oxide synthase inhibition on spatial discrimination learning and central DA2 and m Ach receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81: 32-40.
- Kristek, F., Fáberová, V., Varga, I. (2003). Long-term effect of molsidomine and pentaerythrityl tetranitrate on cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Res.* 52: 709-717.
- Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Silveira, R., Morato, S., Walsh, T.J. (2000). Effects of septal cholinergic lesion on rat exploratory behavior in an open field. *Behav Brain Res* 117: 97-105.
- Law, A., O'Donnell, J., Gauthier, S., Quirion, R. (2002). Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neurosci.* 112(2): 267-275.
- Leanza, G. (1998). Chronic elevation of amyloid precursor protein expression in the neocortex and hippocampus of rats with selective cholinergic lesions. *Neurosci. Lett.* 257: 53-56.
- Leanza, G., Nilsson O.G., Nikkiah G., Wiley R.G., and Björklund. (1996). Effects of neonatal lesions of the basal forebrain cholinergic system by 192 immunoglobulin G-saporin: Biochemical, behavioural and morphological characterization. *Neuroscience* 74(1): 119-141.
- Ledo, A., Frade, J., Barbosa, R.M., Laranjinha, J. (2004). Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol. Asp. Med.* 25: 75-89.
- Lee, C.S., Han, E.S., Park., Bang, H. (2005). Inhibition of MG132-induced mitochondrial dysfunction and cell death in PC12 cells by 3-morpholinopyridone. *Brain Res.* 1036: 18-26.
- Li, S., Quock, R.M. (2002). Effects of a nitric oxide donor on behavior and interaction with nitrous oxide in the mouse light/dark exploration test. *Eur. J. Pharmacol.* 447: 75-78.
- Li, C.Q., Wogan, G.N. (2005). Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett.* 226: 1-5.

Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research* 730: 32-39.

Low, S.Y. (2005). Application of pharmaceuticals to nitric oxide. *Mol. Asp. Med.* 26: 97-138.

Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L., Snyder, S.H. (1994). Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 120(3): 227-237.

Luo, Z.D., Ciskova, D. (2000). The role of nitric oxide in nociception. *Curr. Rev. Pain*; 4: 459-466.

Lüth, H.J., Holzer, M., Gärtner, U., Staufienbiel, M., Arendt, T. (2001). Expression of endothelina and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res.* 913: 57-67.

Madziar, B., Shah, S., Brock, M., Burke, R., López-Coviella, I., Nickel, A.C., Betul-Cakal, E., Blusztajn, J.K., Berse, B. (2008). Nerve growth factor regulates the expression of the cholinergic locus and the high-affinity choline transporter via the Akt/PkB signaling pathway. *J. Neurochem.* 107: 1284-1293.

Madziar, B., López-Coviella, I., Zemelko, V., Berse, B. (2005). Regulation of cholinergic gene expression by nerve growth factor depends on the phosphatidylinositol-3'-kinase pathway. *J. Neurochem.* 92: 767-779.

Magorzata, F., Przegaliński, E. (1998). The Role of the nitric oxide (NO) pathway in the discriminative stimuli of amphetamine and cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59(3): 703-708.

Majlessi, N., Choopani, S., Bozorgmehr, T., Azizi, Z. (2008) Involvement of hippocampal nitric oxide in spatial learning in the rat. *Neurobiol. Learn and Mem.* 90(2): 413-419.

Marletta, M.A., Hurshman, A.R., Rusche, K.M. (1998). Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 656-663.

Márques-Pereira, P., Cosquer, B., Schimchowitsch, S., Cassel, J.C. (2005). Hebb-Williams performance and scopolmine challenge in rats with partial immunotoxic hippocampal cholinergic deafferentation. *Brain Res. Bull.* 64: 381-394.

Martin, M.M., Winter, S.S., Cheatwood, J.L., Carter, L.A., Jones, J.L., Weathered, S.L., Wagner, S.J., Wallace, D.G. (2008). Organization of food protection behavior is differentially influenced by 192 IgG-saporin lesions of either the medial septum or the nucleus basalis magnocellularis. *Brain Res.* 1241: 122-135.

Mattson, A., Pernold, K., Ogren, O., Olson, L. (2004). Loss of cortical acetylcholine enhances amphetamine-induced locomotor activity. *Neurosci.* 127: 579-591.

McKinney, M., Jacksonville, Mayo Clinic. (2005). Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. *Biochem. Pharmacol.* 70: 1115-1124.

McQuail, J.A., Burk, J.A. (2006). Evaluation of muscarinic and nicotinic receptor antagonists on attention and working memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 85: 796-803.

Mesulam, M.M. (2004). The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog. Brain Res.* 145: 67-78.

Meyer C.R., Spangler, E.L., Patel, N., London, E.D., Ingram, D.K. (1998). Impaired learning in rats in a 14-unit T-maze by 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, is attenuated by the nitric oxide donor, molsidomine. *Eur.J. Pharmacol.* 341: 17-22.

Miller, M.R., Megson, I.L. (2007). Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* 151: 305-321.

Miranda K.M, Espey M.G, Wink D.A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 5(1): 62-71.

Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.

Montero-Pastor A. (2004). Efectos de la estimulación eléctrica del núcleo basal magnocelular sobre el condicionamiento de evitación activa de dos sentidos, en ratas. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 169 p.

Mufson, E.J., Counts, S.E., Fahnstock, M., Ginsberg, S.D. (2007). Cholinergic molecular substrates of mild cognitive impairment in the elderly. *Curr. Alzheimer Res.* 4: 340-350.

Napoli, C., Ignarro, L.J. (2003). Nitric oxide-releasing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 97-123.

Newman, L.A., McGaughy, J. (2008). Cholinergic deafferentation of prefrontal cortex increases sensitivity to cross-modal distractors during a sustained attention task. *J. Neurosci.* 28(10): 2642-2650.

Niewiadomska, G., Baksalerska-Pazera, M., Riedel, G. (2009). The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. *Prog. Neuropsych. Biol. Psyc.* 33: 791-805.

Noack, E., Feelisch, M. (1989). Molecular aspects underlying the vasodilator action of molsidomine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14(Suppl. 11): S1-S5.

O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Arancio, O. (1991). Tests of the Roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *PNAS* 88(24): 11285-11289.

Ortiz, P.A., Garvin, J.L. (2003). Trafficking and activation of eNOS in epithelial cells. *Acta Physiol. Scand.* 179: 17-114.

Ou, H.C., Lee, W.J., Lee, S.D., Huang, C.Y., Chiu, T.H., Tsai, K.L., Hsu, W.C., Huey-Hern Sheu, W. (2010). Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density

lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3k/Akt/eNOS pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248: 134-143.

Pae, H.O., Son, Y., Kim, N.H., Jeong, H.J., Chang, K.C., Chung, H.T. (2010). Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO. *Nitric Oxide* 23: 251-257.

Pappas, B.A., Sherren, N. (2003). Neonatal 192 IgG-saporin lesion of forebrain cholinergic neurons: focus on the life span?. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27: 365-376.

Pappas, B. A., Payne, K. B., Fortin, T., Sherren, N. (2005). Neonatal lesion of forebrain cholinergic neurons: Further characterization of behavioral effects and permanency. *Neuroscience* 133(2): 485-492.

Park, Ch.S., Krishna, G., Ahn, .M.S., Kang, J.H., Chung, W.G., Kim, D.J., Hwang, H.K., Lee, J.N., Paik, S.G., Cha, Y.N. (2000). Differential and constitutive expression of neuronal, inducible, and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. *Nitric Oxide* 4(5): 459-471.

Paxinos, G., Watson, Ch. (2005). The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press. 5th ed.

Pedraza, C.E., Podlesniy, P., Vidal, N., Arevalo, J.C., Lee, R., Hempstead, B., Ferrer, I., Iglesias, M., Espinet, C.,(2005). Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am. J. Pathol.* 166: 533-543.

Pérez-Severiano F., Bermúdez-Ocaña D., López-Sánchez P., Ríos C., Granados-Soto V. (2008). Spinal nerve ligation reduces nitric oxide synthase activity and expression: effect of resveratrol. *Pharmacol. Biochem and Behav.* 90(4): 742-747.

Perry, T.A., Hodges, H., Gray, J.A. (2001). Behavioural, histological and immunocytochemical consequences following 192 IgG-saporin immunolesions of the basal forebrain cholinergic system. *Brain Res. Bull.* 54(1): 29-48.

Pichat, P., Bergis, O.E., Terranova, J.P., Urani, A., Duarte, C., Santucci, V., Gueudet, C., Voltz, C., Steinberg, R., Stemmelin, J., Oury-Donat, F., Avenet, P., Griebel, G., Scatton, B. (2007). SSR180711, a novel selective $\alpha 7$ nicotinic receptor partial agonist: (II) efficacy in experimental models predictive of activity against cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol.* 32: 17-34.

Pitsikas, N., Rigamonti, A.E., Cella, S.C., Sakellaridis, N., Muller, E.E. (2005). The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. *Neurobiol. Aging* 26(2): 259-264.

Pitsikas, N., Rigamonti, A.E., Cella, S.C., Muller, E.E. (2002). Effects of the nitric oxide donor molsidomine on different memory components as assessed in the object-recognition task in the rat. *Psychopharmacology.* 162: 239-245.

Pitsikas, N., Rigamonti, A.E., Cella, S.C., Locatelli, V., Sala, M., Muller, E.E. (2001). Effects of molsidomine on scopolamine-induced amnesia and hypermotility in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 426: 193-200.

Podlesniy, P., Kichev, A., Pedraza, C., Saurat, J., Encinas, M., Perez, B., Ferrer, I., Espinet, C. (2006). Pro-NGF from Alzheimer's disease and normal human brain displays distinctive abilities to induce processing and nuclear translocation of intracellular domain of p75NTR and apoptosis. *Am. J. Pathol.* 169: 119-131.

Prast, H., Philippu A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 64(1):51-68.

Prast, H., Philippu A. (1992). Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain. *Eur. J. Pharmacol.* 216(1): 139-140.

Prickaerts, J., Sik, A., Van Staveren, W.C.G., Koopmans, G., Steinbusch, H.W.M., Van der Staay, F.J., De Vente, J., Blokland, A. (2004). Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem. Int.* 45: 915-928.

Prickaerts, J., Van Staveren, W.C.G., Sik, A., Markerink-Van Ittersum, M., Niewöhner, U., Van der Staay, F.J., Blokland, A., De Vente, J. (2002). Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. *Neurosci.* 113(2): 351-361.

Quinlivan, M., Chalon, S., Vergote, J., Henderson, J., Katsifis, A., Kassiou, M., Guilloteau, D. (2007). Decreased vesicular acetylcholine transporter and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor density in the rat brain following 192 IgG-saporin immunolesioning. *Neurosci. Lett.* 415: 97-101.

Ramírez-Lugo, L., Miranda, M.I., Escobar, M.L., Espinosa, E., Bermúdez-Rattoni, F. (2002). The role of cortical cholinergic pre- and post-synaptic receptors in taste memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79: 184-193.

Reynaert, N.L., Ckless, K., Korn, H.K., Vos, N., Guala, A.S., Wouters, E.F.M., Van der Vliet, A., Janssen-Heininger, Y.M.W. (2004). Nitric oxide represses inhibitory κB kinase through S-nitrosylation. *PNAS* 101(24): 8945-8950.

Ricceri, L., Hohmann, C., Berger-Sweeney, J. (2002). Early neonatal 192 IgG saporin induces learning impairments and disrupts cortical morphogenesis in rats. *Brain Res.* 954: 160-172.

Ríos, R., Zarazúa, S., Santoyo, M.E., Sepúlveda-Saavedra, J., Romero-Díaz, V., Jiménez, V., Pérez-Severiano, F., Vidal-Cantú, G., Delgado, J.M., Jiménez-Capdeville, M.E. (2009). Decreased nitric oxide markers and morphological changes in the brain of arsenic-exposed rats. *Toxicology* 261: 68-75.

Robner, S., Schliebs, R., Härtig, W., Bigl, V. (1995). 192 IgG-saporin-induced selective lesion of cholinergic basal forebrain system: neurochemical effects on cholinergic neurotransmission in rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res. Bull.* 38(4): 371-381.

Roux, P. P, Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67(3): 203-233.

Rutten, K., De Vente, J., Sik, A., Markerink-Van Ittersum, M., Prickaerts, J., Blokland, A. (2005). The selective PDE5 inhibitor, sildenafil, improves object memory in Swiss mice and increases cGMP levels in hippocampal slices. *Behav. Brain Res.* 164: 11-16.

Rutten, K., Prickaerts, J., Hendrix, M., Van der Staay, F.J., Sik, A., Blokland, A. (2007). Time-dependent involvement of cAMP and cGMP in consolidation of object memory: studies using selective phosphodiesterase type 2, 4, and 5 inhibitors. *European J.Pharmacol.* 558: 107-112.

Sahagón-Azúa, A. (2010). Posibles alteraciones en el proceso de aprendizaje debidas a la desnutrición temprana en la rata. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México 45 p.

Sambeth, A., Riedel, W.J., Smiths, L.T., Blokland, A. (2007). Cholinergic drug affect novel object recognition in rats: relation with hippocampal EEG?. *European J. Pharmacol.* 572: 151-159.

Sánchez-Ayéndez, M., Cabán, C. A., Fernández, L., Rosich, W., Dávila, A. L., Larriuz, M. C., Hernández, J., García-Guruxarri, A., Palloni, A. (2003). Una escala psicométrica breve para evaluar el estado cognitivo de de hispanoparlantes de edad mayor. *PRHSJ* 22(4): 377-383.

Sapolsky R. M., Krey L. C., McEwen B. S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr. Rev.* 7(3): 284 –301.

Sarter, M., Bruno, J.P., Givens, B. (2003). Attentional functions of cortical cholinergic inputs: what does it mean for learning and memory?. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80(3): 245-256.

Sato, A., Sato, Y., Uchida, S. (2004). Activation of the intracerebral cholinergic nerve fibers originating in the basal forebrain increases regional cerebral blood flow in the rat's cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.* 3611: 90-93.

Sawchenko, P.E., Li, H.Y., Ericsson, A. (2000). Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res* 122:61–78.

Scattoni M. L., Adriani W., Calamandrei G., Laviola G., and Ricceri L. (2006). Long-term effects of neonatal basal forebrain cholinergic lesions on radial maze learning and impulsivity in rats. *Behavioural Pharmacology* 17:517–524.

Schade, D., Kotthaus, J., Clement, B. (2010). Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: Current trends and therapeutic options in cardiovascular disease. *Pharmacol. & Therapeutics* 126: 279-300.

Schmidt, K., Schrammel, A., Koesling, D., Mayer, B. (2001). Molecular mechanisms involved in the synergistic activation of soluble guanylyl cyclase by YC-1 and nitric oxide in endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 59(2):220-224.

Semba, K. (2000). Multiple output pathways of the basal forebrain: Organization, chemical heterogeneity, and Roles in vigilance. *Behav. Brain Res.* 115: 117-141.

Shen, J., Barnes, C.A., Wenk, G.L., McNaughton, B.L. (1996). Differential effects of selective immunotoxic lesions of medial septal cholinergic cells on spatial working and reference memory. *Behav Neurosci* 110: 1181-1186.

Shimoke, K., Kishi, S., Utsumi, T., Shimamura, Y., Sasaya, H., Oikawa, T., Uesato, S., Ikeuchi, T. (2005). NGF- induced phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway prevents thapsigargin-triggered ER stress-mediated apoptosis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 389: 124-128

Siles, E., Martínez-Lara, E., Cañuelo, A., Sánchez, M., Hernández, R., López-Ramos, J.C., Del Moral, M.L., Esteban, F.J., Blanco, S., Pedrosa, J.A., Rodrigo, J., Peinado, M.A. (2002). Age-related changes of the nitric oxide system in the rat brain. *Brain Res.* 956: 385-392.

Siegel, G., Wayne-Albers, R., Brady, S., Price, D. (2006). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.* 7th ed. Elsevier A.P., Canada.

Sjakste, N., Andrianov, V.G., Boucher, J.L., Shestakova, I., Baumane, L., Dzintare, M., Meirena, D., Kalvinsh, I. (2007). Paradoxical effects of two oximes on nitric oxide production by purified NO synthases, in cell culture and in animals. *Nitric Oxide* 17: 107-114.

Small, B.J., Mobly, J.L., Laukka, E.J., Jones, S., Backman, L. (2003). Cognitive deficits in preclinical Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica Suppl.* 179: 29-33.

Sobreviela, T., Jaffar, S., Mufson, E. J. (1998). Tyrosine kinase A, galanin and nitric oxide synthase within basal forebrain neurons in the rat. *Neuroscience* 87(2): 447-461.

Song, W., Volosin, M., Cragolini, A.B., Hempstead, B.L., Friedman, W.J. (2010). ProNGF induces PTEN via p75^{NTR} to suppress Trk-mediated survival signaling in brain neurons. *J. Neurosci.* 30(46): 15608-15615.

Spowart-Manning, L., van der Staay, F.J. (2004). The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse. *Behav Brain Res.* 151(1-2):37-46.

Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82(3): 171-177.

Stirpe, F. (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44: 371-383.

Sugaya, K., Greene, R., Personett, D., Robbins, M., Kent, C., Bryan, D., Skiba, E., Gallagher, M., McKinney, M. (1998). Septo-hippocampal cholinergic and neurotrophin markers in age-induced cognitive decline. *Neurobiol. Aging* 19(4): 351-361.

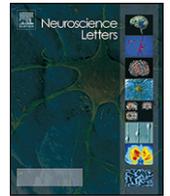
Tenorio F.A, del Valle M.L, Pastelín H.G. (2005). Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* 36(1): 31-41.

- Thatcher, G.R., Nicolescu, A.C. Bennett, B.M., Toader, V. (2004). Nitrates and NO release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 37(8): 1122-1143.
- Thippeswamy, T., McKay, J.S., Morris, R. (2001). Bax and caspases are inhibited by endogenous nitric oxide in dorsal root ganglion neurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1229-1236)
- Tjong, Y.W., Jian, K., Li, M., Chen, M., Gao, T.M., Fung, M.L. (2007). Elevated endogenous nitric oxide increases Ca²⁺ flux via L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosylation in rat hippocampal neurons during severe hypoxia and in vitro ischemia. *Free Radical Biol. & Med.* 42: 52-63.
- Tzavara, E.T, Bymaster, F.P, Felder, C.C, Wade, M, Gomeza, J., Wess, J., et al. (2003). Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M2, M4 and M2/M4 muscarinic receptor knockout mice. *Mol. Psychiatry.* 8(7):673-679.
- Uchida, S., Hotta, H. (2009). Cerebral cortical vasodilatation mediated by nicotinic cholinergic receptors: Effects of old age and of chronic nicotine exposure. *Biol. Pharm. Bull.* 32(3): 341.344.
- Van Donkelaar, E.L., Rutten, K., Blokland, A., Akkerman, S., Steinbuch, H.W.M., Prickaerts, J. (2008). Phosphodiesterase 2 and 5 inhibition attenuates the object memory deficit induced by acute tryptophan depletion. *European J. Pharmacol.* 600: 98-104.
- Vanin, A.F. (2009). Dinitrosyl iron complexes with tiolate ligands: Physico-chemistry, biochemistry and physiology. *Nitric Oxide* 21: 1-13.
- Vincent, S.R. (2010). Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog. Neurobiol.* 90: 246-255.
- Von Bohlen und Halbach, O. (2010). Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. *Frontiers in Aging Neurosci.* 2: 1-11.
- Von Linstow Roloff, E., Harbaran, D., Micheau, J., Platt, B., Riedel, G. (2007). Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. *Neurosci.* 146: 875-889.
- Waite, J.J., Wardlow, M.L., Chen, A.C., Lappi, D.A., Wiley, R.G., Thal, L.J. (1994). Time course of cholinergic and monoaminergic changes in rat brain after immunolesioning with 192 IgG-saporin. *Neurosci. Lett.* 169: 154-158.
- Walsh, T.J., Herzog, C.D., Gandhi, C., Stackman, R.W., Wiley, R.G. (1996). Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits. *Brain Res* 726(1-2): 69-79.
- Wang, P.G., Xian, M., Tang, X., Wu, X., Wen, Z., Cai, T., Janczuk, A.J. (2002). Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. *Chem. Rev.* 102: 1091-1134.
- Wang,H., Ferguson, G.D., Pineda, V.V., Cundiff, P.E., Storm, D.R. (2004). Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat. Neurosci.* 7: 635-642.

- Webster, N.J.G., Pirrung, M.C. (2008). Small molecule activators of the Trk receptors for neuroprotection. *BMC Neurosci.* 9(Suppl 2):S1.
- Wellman, C.L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J. Neurobiol.* 49:245–253.
- Wenk, G.L. (1997). The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67: 85-95.
- Wevers, A. (2010). Localisation of pre-and postsynaptic cholinergic markers in the human brain. *Behav. Brain Res.* 221(2): 341-355.
- Wilson, I.D., Watson, K.V., Troke, J., Illing, H.P.A., Fromson, J.M., Schraven, E. (1986). The metabolism of [¹⁴C]N-ethoxycarbonyl-3-morpholinopyridone (molsidomine) in laboratory animals. *Xenobiotica* 16(12): 1117-1128.
- Willmot, M., Gray, L., Gibson, C., Murphy, S., Bath, P.M.W. (2005). A systematic review of nitric oxide donors and L-arginine in experimental stroke; effects on infarct size and cerebral flow. *Nitric oxide* 12: 141-149.
- Winkler, J., Ramírez, G.A. Thal, L.J., Waite, J.J. (2000). Nerve growth factor (NGF) augments cortical and hippocampal cholinergic functioning after p75NGF receptor mediated deafferentation but impairs inhibitory avoidance and induces fear-related behaviors. *J. Neurosci.* 20(2): 834-844.
- Winters, B.D., Saksida, L.M., Bussey, T.J. (2008). Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32(5): 1055-1070.
- Winters, B.D., Bussey, T.J. (2005a). Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J. Neurosci.* 25: 52-61.
- Winters, B.D., Bussey, T.J. (2005b). Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *European J. Neurosci.* 21: 2263-2270.
- Wolf, N.J. (1996). The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: A hypothesis. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66: 258-266.
- Wrenn, C.C., Wiley, R.G. (1998). The behavioral functions of the cholinergic basal forebrain: lessons from 192 IgG-SAPORIN. *Int. J. Devl. Neurosci.* 16(7-8): 595-602.
- Zhou, L., Zhu, D.Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20: 223-230.

13. APÉNDICES

APÉNDICE 1. Artículo de Investigación: *Molsidomine modulates the cNOS activity in an experimental model of cholinergic damage induced by 192-IgG saporin.*



Molsidomine modulates the cNOS activity in an experimental model of cholinergic damage induced by 192-IgG saporin

M. Alejandra Hernández-Melesio^a, Dinora González-Esquivel^a, Alma Ortíz-Plata^b, Alicia Sánchez-Mendoza^c, Aurora Sánchez-García^b, Mireya Alcaraz-Zubeldia^a, Camilo Ríos^a, Francisca Pérez-Severiano^{a,*}

^a Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur # 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan, México D.F., Mexico

^b Departamento de Patología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur # 3877, Col. La Fama, C.P. 14269, Tlalpan, México D.F., Mexico

^c Departamento de Farmacología, Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", Juan Badiano # 1, Col. Sección XVI, 14080, Tlalpan, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2010

Received in revised form

21 December 2010

Accepted 7 January 2011

Keywords:

Basal forebrain

Cholinergic damage

Nitric oxide synthase

Molsidomine

192 IgG saporin

ABSTRACT

The aim of this work was to study the effect of molsidomine (MOLS), a nitric oxide (NO) donor, on the nitric system changes in an experimental model of cholinergic damage induced by 192 IgG saporin (SAP). Male rats were injured by intraseptal administration of SAP (0.22 µg), after seven days, rats were administered with MOLS (4 mg/kg, i.p.) 60 min before sacrifice. Prefrontal cortex (PC), striatum (S) and hippocampus (HC) were dissected out. Results showed significant recovery of the constitutive NOS activity (cNOS) in PC and S regions by MOLS but not in HC compared against controls. SAP reduced the cellular population in the lesion site and MOLS was able to avoid the progression of damage in this area. NO donor is able to modulate the nitric status in an experimental model induced by SAP.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Immunotoxin 192 IgG saporin (SAP) model has been used in order to analyze the role of basal forebrain (BF) in learning and memory processes as well as the cognitive deficits associated to cholinergic denervation in experimental models. SAP produces selective damage in p75 receptor containing cholinergic neurons of the medial septum nucleus (MS), which provide the major cholinergic innervations to hippocampus (HC) [5]. It has been extensively demonstrated that intraventricular or intraseptal administration of SAP is related to disturbances in cholinergic transmission and also to biochemical and physiological changes *in situ* and in hippocampal areas [10,14,20]. The cholinergic denervation induced by SAP results in the evident depletion of cholinergic markers such as choline acetyltransferase (ChAT) in the presynaptic terminals and also a marked failure in several cognitive tasks [20]. Likewise in humans, the loss of basal forebrain (BF) cholinergic neurons (CBF) has been associated with deficits in cognition in early stages of Alzheimer's disease [5].

The cognitive decline resulting from the injury with SAP is associated with a neurotrophic malfunction. Nerve growth factor

(NGF) is a signaling molecule that regulates the survival and neuronal maintenance of CBF neurons. NGF signaling in MS neurons is thought to occur after the binding to and activation of both TrkA and p75 receptors. Thus, the NGF/TrkA-p75 complex is then internalized to soma by retrograde transport. The down regulation of TrkA expression alters the retrograde transport of NGF to target MS neurons and may have important consequences related to apoptosis [8].

In addition to NGF, nitric oxide (NO) is also required for CBF neurons survival and the delivery of NGF seems to be related to modulation of excessive NO production in order to prevent excitotoxicity. The role of NO as a neuromodulator in BF and as a regulator of cerebral blood flow suggests a relationship between cholinergic and nitric systems. SAP reduces the cortical blood flow and alters the catalytic activity and substrate binding of hippocampal neuronal nitric oxide synthase isoform (nNOS) [12].

The relationship between NO and cholinergic system has been evidenced by blocking cognition through the use of NOS inhibitors, while NO donors can facilitate it [7,21]. The NO donor molsidomine (MOLS) has been used as a pharmacological tool in order to antagonize the cognitive deficit associated to cholinergic hypofunction produced by scopolamine (SCO). The successful of MOLS on the recovery of cognitive impairment could be associated to its high

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5606 3822x2005; fax: +52 55 5424 0808.
E-mail address: fperez@innn.edu.mx (F. Pérez-Severiano).

bioavailability, long-lasting duration of action and the lack of overt side effects at doses displaying an anti-amnesic action [21]. Nevertheless, the participation of NO in the recovery of cholinergic deficit caused by SAP administration has not been analyzed.

In the present study we used the experimental cholinergic damage model induced by SAP in rats, in order to evaluate the effect of the NO donor MOLS. We also evaluated the nitric system in rats, determining calcium-dependent and calcium-independent NOS activities, as well as the expression of nNOS in HC region.

All animal procedures were performed according to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the local guidelines on the ethical use of animals from the Ministry of Health in Mexico. All efforts were made to minimize animal suffering.

To carry-out the present experiments, we used 132 adult male Wistar rats (250–300 g) for the different evaluations. Under sodium pentobarbital anesthesia (40 mg/kg i.p.), animal groups were injected in MS with 1 μ l of SAP (0.22 μ g, Chemicon International Inc., CA, USA) or 1 μ l of vehicle (PBS 0.1 M pH 7.4) both at 0.25 μ l/min according to the coordinates: AP +0.6, L 0.0, V –7.0 from bregma [18]. After seven days, SAP group was divided into isotonic saline solution (SS, i.p.) and MOLS (4 mg/kg i.p.) (N-[etoxy-carbonil]-3-[4-morpholino-sydnonimine] Sigma–Aldrich, Mexico). Parallely, PBS groups were also divided in SS and MOLS subgroups. Rats were allowed to recover from anesthesia and surgical procedures, keeping them warmed and then were housed into acrylic cages with sterile sawdust, grouping five animals per cage in a regulated environment (temperature, humidity, light, etc.) with free access to food and water.

In order to discard some motor disturbances or sedation effects related to SAP, MOLS or vehicles, the total motor activity task was evaluated 7 days after the administration of SAP and 60 min after MOLS injection, into an automated cage (Opto-Varimex Minor; Columbus Instruments, Ohio). Considering that the amnesic SCO is widely used as a control of hyperactivity [21], a group of 16 rats was used as a positive control of hyperactivity, and was injected with SCO (0.5 mg/kg s.c.) 60 min before evaluation. This procedure was performed according to the protocol described by Pitsikas et al. and Reddy and Kulkarni [21,22]. Each rat was randomly chosen and placed in the automatic cage for a 30 min habituation period. Thereafter, horizontal, vertical and ambulatory activity was monitored for 10 min.

Constitutive NOS (cNOS) comprises the calcium-dependent endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) isoforms. While inducible NOS (iNOS) refers to calcium-independent isoform.

In order to assess the NOS activity and expression, and considering also that at 7th day posterior to SAP lesion the evident decay of cognition has been observed [5], 28 animals (7 rats per experimental condition) were sacrificed by decapitation 7 days after the surgery, and 60 min after the injection of MOLS or SS [21].

The NOS activity was evaluated by the indirect measuring method described by Bredt and Snyder (1990) and modified by Pérez-Severiano et al. for brain tissue [19]. This technique quantifies the stoichiometric conversion of [3 H]-L-arginine to [3 H]-L-citrulline plus NO. Prefrontal cortex (PC), striatum (S), and hippocampus (HC) areas were dissected out over ice and frozen in liquid nitrogen. The samples were stored at –70 °C until NOS activity and expression analyses were performed. Tissues were homogenized at 4 °C in a glass homogenizer using a teflon pestle, with 250 μ l of a buffer containing: 50 mM Tris–HCl and pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% β -mercaptoethanol pH 7.5, containing a cocktail of protease inhibitors (100 μ M leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml of soybean trypsin inhibitor and 0.1% v/v Nonidet P-40).

Sample protein content in PC, S and HC regions was measured by Lowry method [15]. After protein determination, volumes

containing 500 μ g of protein were incubated during 30 min at 37 °C in the presence of 10 μ M L-arginine-HCl, 1 mM NADPH, 100 nM calmodulin, 30 μ M tetrahydrobiopterin, 2.5 mM CaCl₂, and 0.2 μ Ci of [3 H]-L-arginine (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) in order to evaluate cNOS activity. The maximum volume used for each reaction was 100 μ l.

The activity of iNOS was tested by the samples incubation in the presence of EGTA without CaCl₂. Reaction was stopped by adding a buffer containing 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH 5.5. The reaction mixture was then transferred into a cation exchange resin column (Dowex-50W-200, Sigma–Aldrich Co. St. Louis Mis., USA) which had previously been equilibrated with the stop buffer. This column retains labeled arginine and allows [3 H]-L-citrulline to flow through itself. Labeled L-citrulline amount was measured using a Beckman LS6500 scintillation counter. Results were expressed as ng of L-citrulline/500 μ g protein/30 min.

With the aim to determine the nitric status in HC, which is the target region of the cholinergic innervation from MS, the expression of hippocampal nNOS was carried-out using the homogenized hippocampal region ($n = 3$ per treatment and control): samples containing 30 μ g of protein were aligned and carried out on a 10% Tris/glycine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then were transferred onto hybond polyvinylidene fluoride membrane (PVDF, Amersham Biosciences, UK). Blots from each sample were blocked with a PBS/0.05% Tween 20 buffer solution containing 5% of non-fat milk, during 1 h at room temperature, and then were incubated overnight at 4 °C with two antibodies: polyclonal mouse antibody against nNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at a final dilution of 1:3000 as well as with a monoclonal mouse antibody against β -actin, using the same dilution. After incubation, membranes were then washed and incubated with their respective secondary peroxidase goat antibodies, diluted 1:3000. Blots were washed again and the protein was developed using the ECL detection system (Perkin Elmer Inc, Waltham MA, USA).

The presence of nNOS was normalized by β -actin, the reference protein. The film images were digitally acquired with a BioDoc-It System (UVP, CA, USA). The densitometric analysis was performed using the LabWorks 4.0 Image Acquisition and Analysis Software (UVP, CA, USA). The densitometric scanning protein density data were expressed as optical density arbitrary units (OD).

Histological procedures were performed according to Gridley [9]. Rats from the experimental groups were anesthetized with sodium pentobarbital anesthesia (40 mg/kg i.p.), and transcardially perfused with phosphate buffered saline containing heparin (5000 IU/ml), diluted 1/500, v/v followed by 4% (v/v) paraformaldehyde solution (in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) at 4 °C. Brains were removed, postfixed in the same fixative solution for 24 h and immersed in paraffin. Tissue was sectioned on a microtome, and sections (7 μ m of thickness) were obtained from the lesioned zone. All sections were stained with cresyl violet 0.2% in order to identify cell bodies and to verify changes in the population density at 20 \times magnification. The sections were observed under a wide-field microscope (Olympus H2).

All results are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was achieved by one way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's *post hoc* test. For all cases, values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

With the aim to demonstrate that SAP and MOLS did not show any effect over motor activity, we evaluated the motor activity in PBS control group and also in groups treated with SAP or MOLS; the results demonstrated no significant differences between treatments for the ambulatory ($F = 19.81_{0.95; 5.84}$), horizontal ($F = 20.18_{0.95; 5.84}$) and vertical activities ($F = 14.23_{0.95; 5.84}$). Nevertheless, the administration of SCO caused significant hyperactivity (ambulatory: 760.2 ± 97.94 , horizontal: 1199 ± 113.5 ; vertical: 409.7 ± 63.16) in comparison with PBS group (ambulatory:

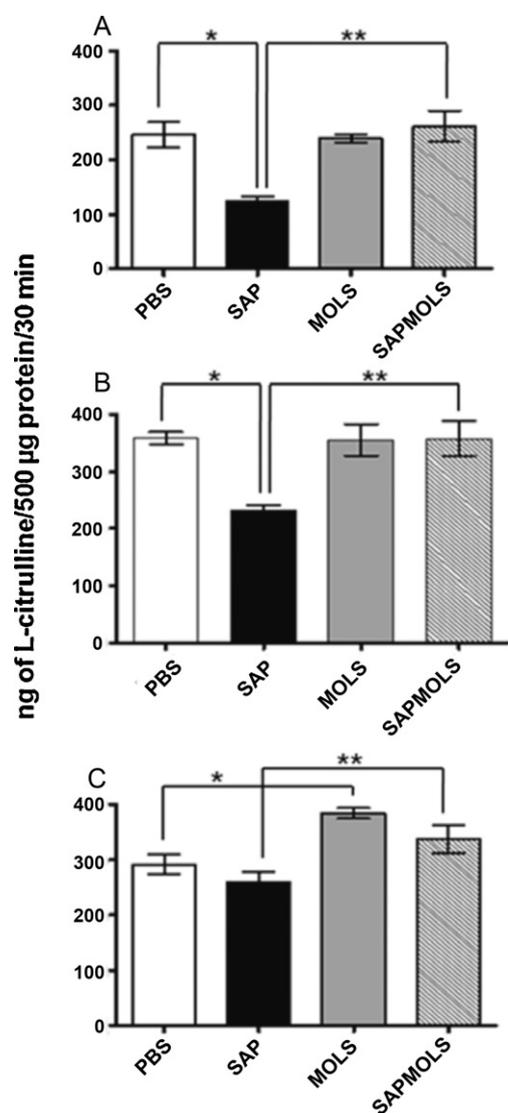


Fig. 1. MOLS effect on calcium-dependent NOS activity in brain regions after the lesion with SAP. Prefrontal cortex (A), striatum (B) and hippocampus (C). Each bar represents the mean \pm S.E.M. of 7 independent experiments. ANOVA (*, ** $p < 0.05$), *post hoc* Tukey.

142.1 \pm 27.51, horizontal: 347.1 \pm 57.42; vertical: 63.38 \pm 13.61). These results have shown that SAP is a suitable model to evaluate the specific effect of MOLS upon cognitive decline, since there was not alteration in the motor activity test that could influence the animal performance in future cognitive tasks.

In the present study the results of MOLS effect upon NOS activity, after the MS injury, are shown in Fig. 1. In control PBS group, basal cNOS activity values were 245.8 \pm 23.31 in PC, 358.8 \pm 10.9 in S and 291.5 \pm 17.8 in HC regions. After MOLS treatment the basal levels of cNOS activity were not altered neither in PC (239.5 \pm 7.4) or S (355.5 \pm 27.9) areas; but in HC it was found a statistical significant increase (377.9 \pm 24.9), when all groups were compared against their respective PBS group. On the other hand, when the SAP group was compared against its corresponding controls it was found a significant reduction on the calcium-dependent NOS activity in PC and S area, 123.9 \pm 9.4 and 231.2 \pm 9.3, respectively. However, no significant decrease was found in HC region after the intraseptal administration of SAP compared against PBS control.

As it was expected, in the group treated with MOLS after SAP it was found a reverted effect causing an increase in cNOS activity: PC (261.8 \pm 27.9), S (358.2 \pm 31.5) and HC regions (337 \pm 25),

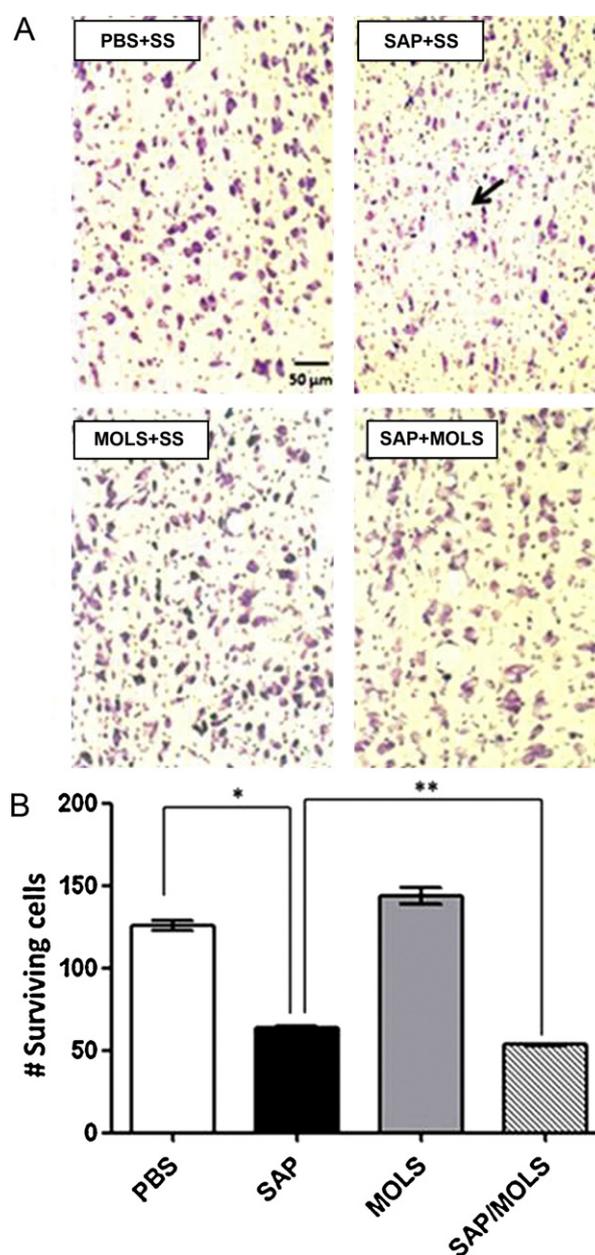


Fig. 2. (A) Representative photomicrographs of septal sections stained with cresyl violet 7 days after administration of SAP. Scale bar 50 μ m (20 \times). (B) Number of surviving cells with the different treatments. Values are means \pm S.E.M. ($n = 3$) and statistical analysis was carried out with ANOVA (*, ** $p < 0.05$), *post hoc* Tukey.

when they were compared against the SAP group. Concerning to iNOS activity, the analysis did not show evident change in enzymatic activity in the three regions analyzed: PC ($F = 0.7191_{0.95; 3,8}$), S: ($F = 0.8342_{0.95; 3,8}$) and HC ($F = 1.880_{0.95; 3,8}$).

Analyzing the data of hippocampal nNOS expression, we were not able to find significant differences between groups in comparison with the PBS control group or among them ($F = 1.401_{0.95; 3,16}$).

Afterward, it was evaluated the vulnerability of the MS neurons to SAP and the effect of NO over the cellular damage induced by the immunotoxin. The qualitative analysis of photomicrographs showed that administration of SAP decreased the septal cellular population compared to PBS and MOLS groups as it is showed in Fig. 2(A) by the black arrow. This result did not show evident changes in cellular population in comparison with the representative SAP+MOLS coronal sections. In the septal area of SAP group it can be observed few and smaller cell somata than PBS group,

although some of them contain pyknotic nuclei (Fig. 2(A)). Despite the co-existence of normal cell bodies and neurons with morphological changes, the appearance of the intact remaining cells in the SAP+MOLS group was better preserved than those observed in SAP+SS sections. This suggests that MOLS could avoid the progression of cellular damage induced by SAP.

The semi-quantitative analysis of the histological changes in all medial septum sections is depicted in Fig. 2(B). SAP administration reduced in a 50% the septal neurons (63.79 ± 1.33) in relation to control group PBS (126.0 ± 2.97). In MOLS group, the number of surviving cells, which are presumably cholinergic, was similar to control group (143.7 ± 5.10). In the SAP+MOLS group, treatment with MOLS had not effect on the recovery of cellular population in the lesion site compared with SAP (53.19 ± 0.58).

The SAP model has been used to produce selective cholinergic lesions in BF, resulting in a marked cholinergic hypofunction associated to the decrease of cognitive processes. In the present study the SAP model allowed us to show the nitrenergic system modulation induced by the NO donor, MOLS.

NO and acetylcholine (ACh) are two important neuromodulators that play a major role in the learning and memory processes as well as in the cortical perfusion mechanism [16].

In the present study, it was examined the effect of the NO donor MOLS upon the activity of the cNOS in three different brain regions, PC, S and HC and the expression of hippocampal nNOS, 7 days after the intraseptal lesion with SAP. The results concerning to reduction of cNOS activity in PC area as a consequence of SAP injection were similar to results found by Hartlage-Rübsamen and Schliebs [12] in a model of cholinergic denervation. The observed effect of SAP over the cNOS catalytic activity in PC and S could be associated to the decreased synthesis and release of ACh by cholinergic fibers in these regions. The ACh decrement could then be a consequence of neuronal population decrease in the MS, results that were obtained through a qualitative assay with cresyl violet staining (Fig. 2). The recovery of cNOS basal activity observed in PC and S regions was promoted by MOLS administration and could be the result of direct guanylyl cyclase stimulation by the exogenous NO as well as the increase in cGMP levels at the synaptic cleft [6]. Following the same line, these events could activate a cyclical mechanism which indeed might increase the ACh release by the remaining septal cholinergic neurons and, then induce the subsequent intracellular Ca^{2+} raising through NMDA receptors [13]. This high intracellular Ca^{2+} concentration then causes the stimulation of cNOS activity, cGMP/NO synthesis and increases ACh release [3,7,11]. Considering this cascade of events it is plausible that the single dose used and the short schedule of MOLS administration described in this study (60 min before the harvest of PC, S and HC) causes the enhancement of ACh as a short-term mechanism.

The transduction signaling pathways may also help to explain the results found in this study. Gu et al. showed that cholinergic denervation from CBF using SAP model was related to down regulation of mature NGF levels and TrkA-NGF receptor expression in target regions and in HC [10]. Culmsee et al. (2005) demonstrated that in absence of NGF, NO donors stimulate nNOS and eNOS activity and also can inhibit the apoptosis mediated by the p75 receptor through the phosphorylation of TrkA, the activation of PI3-K/Akt and the ERK1/2 pathway [1,2,17]. Although the specific action of MOLS over the regulation of NOS activity is still uncertain and may involve many pathways, our results allow us to speculate that MOLS is able to modulate the expression of TrkA receptor and also to balance pro-NGF/NGF ratios. The enhancement in retrograde axonal transport of NGF to MS might promote the ACh release and the stimulation of eNOS and nNOS activity by NO/cGMP. These findings are in accordance with the up-regulation of ChAT mRNA associated to NGF levels that was found by Klein et al. [14]. The relationship between cholinergic and nitrenergic systems has been demonstrated

through the administration of cholinergic agonists in experimental models which increase the levels of hippocampal cGMP [4,3].

Analyzing the data of cNOS activity in all the regions, it was observed that SAP decreased the enzymatic activity in PC and S, however in HC there was not effect. Then in HC region there could be involved compensatory mechanisms as well as some other non cholinergic resources of NOS, as glutamatergic synapses, which can explain the significant increase of cNOS activity in those groups treated with MOLS. In consequence it looks as if MOLS replaces, partially at least, the missing NO after cholinergic denervation.

The up-regulation of cholinergic markers such as ChAT may underlie the efficacy of MOLS to improve memory performance in patients with vascular and Alzheimer's like dementia as do with animals exposed to SAP. MOLS possibly will be acting as a modulator of nitrenergic system in the model of cholinergic denervation induced by SAP and could also promote the recovery of the cholinergic function in the septo hippocampal pathway. Further cognitive, biochemical and immunohistochemical studies are needed to carry out in order to understand the cholinergic recovery and the signal transduction pathway for the nitrenergic activity induced by MOLS.

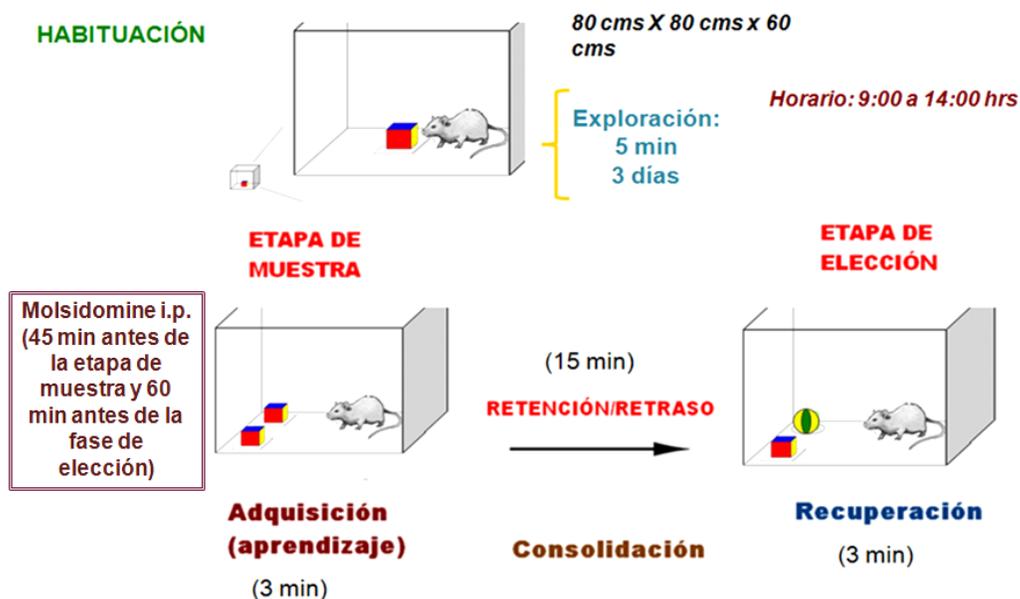
Acknowledgements

This work was supported by CONACYT (fellowship number 165271 and Grants numbers 61327 F.P.S. and 52198 D.F.G.E.). We would like to thank to the Biological Science Postgraduate of Medicine Faculty UNAM, Mexico for its kind support for the realization of these studies.

References

- [1] K. Akassoglou, Nerve growth factor-independent neuronal survival: a role of NO donors, *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 952–955.
- [2] C. Culmsee, N. Gerling, S. Landshamer, B. Rickerts, H.J. Duchstein, K. Umezawa, S. Klumpp, J. Kriegelstein, Nitric oxide donors induce neurotrophin-like survival signaling and protect neurons against apoptosis, *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 1006–1017.
- [3] J. De Vente, cGMP: a second messenger for acetylcholine in the brain? *Neurochem. Int.* 45 (2004) 799–812.
- [4] J. De Vente, K. Abildayeva, M. Van de Waarenburg, M. Markerink-van Ijtersum, H.W.M. Steinbusch, M. Mulder, NO-mediated cGMP synthesis in cultured cholinergic neurons from the basal forebrain of the fetal rat, *Brain Res.* 1217 (2008) 25–36.
- [5] N.F. Fitz, R.B. Gibbs, D.A. Johnson, Aversive stimulus attenuates impairment of acquisition in a delayed match to position T-maze task caused by a selective lesion of septo-hippocampal cholinergic projections, *Brain Res. Bull.* 69 (2006) 660–665.
- [6] R.S. Fitzgerald, M. Shirahata, I. Chang, The effect of a nitric oxide donor, sodium nitroprusside, on the release of acetylcholine from the in vitro cat carotid body, *Neurosci. Lett.* 385 (2005) 148–152.
- [7] M. Gerová, F. Kristek, Efficiency of NO donors in substituting impaired endogenous NO production: a functional and morphological study, *Physiol. Res.* 50 (2005) 165–173.
- [8] S.D. Ginsberg, S. Che, J. Wu, S.E. Counts, E.J. Mufson, Down regulation of trk but not p75^{NTR} gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 97 (2006) 475–487.
- [9] M.F. Gridley, *Manual of Histology and Special Staining Techniques*, 2nd ed., McGraw Hill, New York, 1953.
- [10] Z. Gu, T. Toliver-Kinsky, J. Glasgow, K. Werrbach-Perez, J.R. Perez-Polo, NGF-mediated alteration of NF- κ B binding activity after partial immunolesions to rat cholinergic basal forebrain neurons, *Int. J. Dev. Neurosci.* 18 (2000) 455–468.
- [11] H.E. Harooni, N. Naghdi, H. Sepehri, A.H. Rohani, The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats, *Behav. Brain Res.* 201 (2009) 166–172.
- [12] M. Hartlage-Rübsamen, R. Schliebs, Rat basal forebrain cholinergic lesion affects neuronal nitric oxide synthase activity in hippocampal and neocortical target regions, *Brain Res.* 889 (2001) 155–164.
- [13] R.A. Hopper, J. Garthwaite, Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation, *J. Neurosci.* 26 (2006) 11513–11521.
- [14] R.L. Klein, D. Nuir, M.A. King, A.L. Peel, S. Zolotukhin, J.C. Möller, A. Krüttgen, J.V. Heymach Jr., N. Muzyczka, M. Meyer, Long-term actions of vector-derived nerve growth factor of brain-derived neurotrophic factor on choline acetyltransferase and TRK receptor levels in the adult rat basal forebrain, *Neuroscience* 90 (1999) 815–821.

- [15] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [16] O.P. Mishra, R. Mishra, Q.M. Ashraf, M. Delivoria-Papadopoulos, Nitric oxide-mediated mechanism of neuronal nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase expression during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets, *Neuroscience* 140 (2006) 857–863.
- [17] C. Napoli, L.J. Ignarro, Nitric oxide-releasing drugs, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43 (2003) 97–123.
- [18] G. Paxinos, P. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, 1998.
- [19] F. Pérez-Severiano, D. Bermúdez-Ocaña, P. López-Sánchez, C. Ríos, V. Granados-Soto, Spinal nerve ligation reduces nitric oxide synthase activity and expression: effect of resveratrol, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90 (2008) 742–747.
- [20] T.A. Perry, H. Hodges, J.A. Gray, Behavioural, histological and immunocytochemical consequences following 192 IgG-saporin immunolesions of the basal forebrain cholinergic system, *Brain Res. Bull.* 54 (2001) 29–48.
- [21] N. Pitsikas, A.E. Rigamonti, S.G. Cella, V. Locatelli, M. Sala, E.E. Muller, Effects of molsidomine on scopolamine-induced amnesia and hypermotility in the rat, *Eur. J. Pharmacol.* 426 (2001) 193–200.
- [22] D.S. Reddy, S.K. Kulkarni, Possible role of nitric oxide in the non tropic and anti-amnesic effects of neurosteroids on aging- and dizocilpine-induced learning impairment, *Brain Res.* 799 (1998) 215–229.



APÉNDICE 2. Prueba de memoria de reconocimiento de objetos. Ilustración que muestra la posición de los objetos utilizados en el periodo de habituación y en las etapas de muestra (objetos idénticos) y de elección (objeto familiar y novedoso) que integran la prueba experimental. También se indica el tiempo de administración de una dosis única de molsidomine (4 mg/kg) antes de la realización de la prueba.

APÉNDICE 3. ÍNDICE DE DISCRIMINACIÓN (D)

El registro en video de los animales durante la prueba de reconocimiento de objetos, ofrece la posibilidad de obtener una secuencia progresiva de eventos y analizar diversos parámetros con base al tiempo de exploración de los objetos utilizados durante la realización de la prueba. Una medida que está reportada ampliamente, es el índice de discriminación (D). El índice D representa la diferencia en el tiempo de exploración, expresado como una proporción del tiempo total de exploración de los dos objetos durante la fase de elección. Por lo tanto, este parámetro permite analizar si una rata es capaz de recordar un objeto mostrado previamente (memoria de reconocimiento) y en consecuencia, incrementar su conducta exploratoria hacia un objeto desconocido o novedoso. La obtención del índice D se puede realizar tomando en cuenta: (a) Frecuencia

de aproximación, que está basada en el número de veces que una rata se ha aproximado al objeto novedoso, comparado con la frecuencia de las aproximaciones al objeto familiar. (b) Latencia del primer acercamiento, el cual compara el tiempo que tarda una rata en aproximarse por primera vez al objeto novedoso, con la latencia de la primera aproximación con el objeto familiar. (c) Duración de los acercamientos, que se basa en el tiempo que dedica un animal a la exploración del objeto novedoso, en comparación con el tiempo de exploración del objeto familiar. (d) Duración promedio de los acercamientos, el cual se basa en el tiempo de exploración promedio del objeto novedoso en comparación con el tiempo de exploración promedio del objeto familiar. El tiempo promedio se refiere al tiempo total de exploración de un objeto dividido entre la frecuencia de acercamientos a dicho objeto.

Un valor del índice D significativamente mayor a 0 describe la exploración del animal preferentemente hacia el objeto novedoso, mientras que un valor de D por debajo de 0, indica una exploración mayor del objeto familiar.