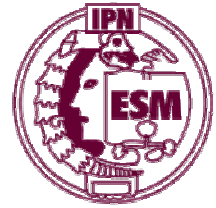


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

**“SÍNTESIS Y EVALUACIÓN COLINÉRGICA
CENTRAL DE SUCCINAMIDA Y SUCCINIMIDA
ACETILADA DE *p*-AMINOFENOL”**

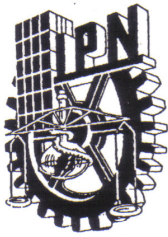
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO
**DOCTOR EN INVESTIGACIÓN
EN MEDICINA**

PRESENTA

M. en C. Judith Espinosa Raya

México, D.F.; Diciembre 2006.



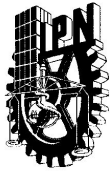
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 17 del mes de noviembre del año 2006, la que suscribe **JUDITH ESPINOSA RAYA** alumna del Programa de **DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA** con número de registro **B-031280**, adscrito a la **ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los **DRS. JOSE GUADALUPE TRUJILLO FERRARA y OFIR PICAZO PICAZO** y cede los derechos al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección judaer@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

JUDITH ESPINOSA RAYA



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 17 del mes de noviembre del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis de grado titulada:

"SÍNTESIS Y EVALUACIÓN COLINERGICA CENTRAL DE SUCCINAMIDA Y SUCCINIMIDA ACETILADA DE ρ -AMINOFENOL"

Presentada por el alumno:

ESPINOSA
Apellido paterno

RAYA
materno

JUDITH
nombre(s)

Con registro:

B	0	3	1	2	8	0
---	---	---	---	---	---	---

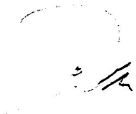
aspirante al grado de:

DOCTOR EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


DR. GUILLERMO MANUEL CEBALLOS REYES
PRESIDENTE DEL JURADO


DR. OFIR PICAZO PICAZO
SECRETARIO DEL JURADO


DR. JOSÉ GUADALUPE TRUJILLO FERRARA
1ER. VOCAL DEL JURADO


DR. EDUARDO RAMÍREZ SAN JUAN
2DO. VOCAL DEL JURADO


DR. MARTHA GARCÍA RAMÍREZ
3ER. VOCAL DEL JURADO


DR. JOEL LOMELÍ GONZÁLEZ
VOCAL SUPLENTE

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


M. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA


INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

El presente trabajo de Investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica Médica I y en el Laboratorio de Farmacología conductual de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección y supervisión de los Doctores José G. Trujillo Ferrara y Ofir Picazo Picazo

Este trabajo se realizó mediante el apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 165468

ESTRUCTURA DEL TRABAJO

Tomando como base la hipótesis colinérgica de la enfermedad de Alzheimer, en este trabajo se sintetizaron dos análogos de acetilcolina derivados del *p*-aminofenol siguiendo el protocolo de la Química Verde; éstos derivados se caracterizaron por diferentes métodos espectroscópicos y espectrométricos, así como por difracción de rayos X. Además, se evaluó su actividad colinérgica central determinando su afinidad por receptores muscarínicos en membranas de hipocampo de rata y su capacidad de bloquear la amnesia inducida por escopolamina en dos modelos de memoria y aprendizaje.

CONTENIDO GENERAL

ÍNDICE	II
ÍNDICE DE FÍGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
GLOSARIO	VII
RESUMEN	IX
SUMMARY	X

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. QUÍMICA DE LA ACETILCOLINA.....	6
2.2. SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA.....	7
2.3. ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO CENTRAL.....	11
2.3.1. RECEPTORES A ACETILCOLINA.....	11
2.3.1.1. Receptores muscarínicos.....	11
2.3.1.2. Receptores nicotínicos.....	14
2.3.2. VÍAS CEREBRALES COLINÉRGICAS.....	16
2.3.2.1. El sistema colinérgico del cerebro anterior.....	17
2.3.2.1.1. Núcleo basal magnocelular.....	19
2.3.2.1.2. Complejo de la banda diagonal-septum medial.....	20
2.3.3. FUNCIONES DE LA ACETILCOLINA MEDIADAS POR RECEPTORES MUSCARÍNICOS.....	21
2.4. MEMORIA Y APRENDIZAJE.....	23
2.4.1. MEMORIA.....	23
2.4.2. APRENDIZAJE.....	24
2.4.2.1. Aprendizaje asociativo.....	25
2.4.2.2. Aprendizaje de tipo automoldeamiento.....	27
2.5. MODELOS CELULARES DE MEMORIA Y APRENDIZAJE....	29
2.5.1. APRENDIZAJE EN EL CIRCUITO REFLEJO DE RETRACCIÓN DE LA BRANQUIA EN LA <i>APLYSIA</i>	30
2.5.2. POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO EN EL HIPOCAMPO..	33
3. JUSTIFICACIÓN.....	37
4. HIPÓTESIS.....	41
5. OBJETIVO GENERAL.....	42
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	42
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
7.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	43
7.2. REACTIVOS Y FARMACOS.....	43
7.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS	43

7.3.1. SÍNTESIS DE LA SUCCINAMIDA DE <i>p</i> -AMINOFENOL.....	43
7.3.2. SÍNTESIS DE LA SUCCINIMIDA ACETILADA DE <i>p</i> -AMINOFENOL.....	44
7.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS DE <i>p</i> AMINOFENOL.....	44
7.4. ESTUDIOS DE AFINIDAD DE LOS COMPUESTOS POR UNIÓN DE RADIOLIGANDO A LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS.....	46
7.4.1. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS.....	46
7.4.2. ENSAYOS DE SATURACIÓN.....	46
7.4.3. ENSAYOS DE COMPETENCIA.....	47
7.4.4. PRUEBA DE PROPORCIÓN DE AFINIDAD.....	48
7.5. MODELOS DE AMNESIA INDUCIDA POR ESCOPOLAMINA	48
7.5.1. MODELO DE APRENDIZAJE DE TIPO AUTO-MOLDEAMIENTO.....	48
7.5.2. LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE T.....	50
7.6. PRUEBA DE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA.....	52
7.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
8. RESULTADOS DE LA SÍNTESIS.....	53
8.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA SÍNTESIS.....	60
9. RESULTADOS FARMACOLÓGICOS.....	62
9.1. ENSAYOS DE SATURACIÓN.....	62
9.2. ENSAYOS DE COMPETENCIA.....	63
9.3. PRUEBA DE PROPORCIÓN DE AFINIDADES.....	64
9.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS FARMACOLÓGICOS.....	66
10. RESULTADOS CONDUCTUALES.....	74
10.1. MODELO DE APRENDIZAJE DE TIPO AUTO-MOLDEAMIENTO.....	74
10.2. LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE T.....	78
10.3. PRUEBA DE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA.....	82
10.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS CONDUCTUALES.....	83
11. CONCLUSIONES GENERALES.....	91
12. PERSPECTIVAS.....	93
13. BIBLIOGRAFÍA.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructura de la acetilcolina
2. Neurotransmisión colinérgica
3. Estructura transmembrana y secuencia de aminoácidos del receptor muscarínico M₁ humano
4. Estructura transmembrana del receptor nicotínico
5. Sistema colinérgico central y sus proyecciones
6. Estructura química de los derivados del *p*-aminofenol sintetizados en este estudio
7. Ruta de síntesis de derivados de *o*, *m* y *p*-aminofenol
8. Espectro de RMN ¹H para succinimida acetilada de *p*-aminofenol
9. Espectro de RMN ¹³C para succinimida acetilada de *p*-aminofenol
10. Espectro de masas para succinimida acetilada de *p*-aminofenol obtenido por impacto electrónico
11. Perspectiva de la estructura molecular de succinimida acetilada de *p*-aminofenol
12. Unión de [³H]N-metilescopolamina ([³H]NMS) a membranas de hipocampo de rata
13. Inhibición de la unión de la [³H]NMS a membranas de hipocampo de rata por la succinamida de *p*-aminofenol
14. Inhibición de la unión de la [³H]NMS a membranas de hipocampo de rata por la succinimida de *p*-aminofenol
15. Unión de la [³H]NMS a membranas de hipocampo incubadas en presencia de concentraciones crecientes de carbacol y una concentración fija de la succinamida de *p*-aminofenol (*o*) o en ausencia de ésta (●).
16. El modelo del complejo terciario de la interacción alostérica
17. Inhibición de la amnesia inducida por escopolamina tras la administración i.p de los compuestos usados como controles
18. Inhibición de la amnesia inducida por escopolamina tras la administración i.p de dosis crecientes de la succinamida de *p*-aminofenol
19. Inhibición de la amnesia inducida por escopolamina tras la administración i.p de la succinimida acetilada de *p*-aminofenol

20. Efecto de la administración de los diferentes compuestos utilizados en ratas sometidas a la sesión de entrenamiento en el LET

21. Efecto de la administración de los diferentes compuestos utilizados en ratas sometidas a la sesión de prueba en el LET

22. Efecto de la administración de los diferentes compuestos utilizados en ratas evaluadas en la prueba de actividad espontánea

ÍNDICE DE TABLAS

1. Resultados de la síntesis de los compuestos
2. Datos cristalográficos para succinimida acetilada de *p*-aminofenol
3. Frecuencia de ensayos en la sesión de entrenamiento en ratas sometidas al LET
4. Actividad de evaluación de riesgo en la sesión de entrenamiento en ratas sometidas al LET

GLOSARIO

AcetilCoA	Acetilcoenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ANOVA	Análisis de varianza
BA	Brazo abierto
BD-SM	Banda diagonal-Septum medial
C	Carbono
CaCl₂	Cloruro de calcio
CAT	Colinoacetiltransferasa
cm	centímetro
DMSO d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EA	Enfermedad de Alzheimer
EC	Estimulo condicionado
E-E	Estimulo-Estimulo
EE	Error estándar
EGTA	Etilen glicol –bis (2 aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético
EI	Estimulo incondicionado
Emie	Espectroscopía por impacto electrónico
E-R	Estimulo respuesta
ESC	Escopolamina
E.U	Estados Unidos
FSN	Factor sensible a N-Etilmaleimida
GABA	Ácido gamma amino butírico
GAL	Galantamina
h	hora
H	Hidrógeno
[³H]NMS	[³ H]N-metil-escopolamina
IP₃	Inositol trifosfato
i.p	intraperitoneal
IR	Índice de riesgo
IRR	Infrarrojo
KBr	Bromuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
K_d	Constante de disociación
kg	Kilogramo
KH₂PO₄	Fosfato de potasio dibásico
k_{off}	Velocidad de disociación
k_{on}	Velocidad de asociación
LET	Laberinto en T elevado
MCT	Modelo del complejo terciario
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio

MHz	MegaHertz
mg	Miligramo
min	minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
m/z	Índice masa/carga
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NBM	Núcleo basal magnocelular
nM	Nanomolar
NMDA	N-metil- D- aspartato
NS	No significativa
pH	Potencial de hidrógeno
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLP	Potenciación a largo plazo
ppm	Partes por millón
RAPG	Receptores acoplados a proteínas G
RC	Respuesta condicionada
REI	Respuesta de evitación pasiva
RM	Receptor muscarínico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RN	Receptor nicotínico
s	segundo
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
Tris-HCl	Tris (hidroximetil)aminoetil clorhidrato
VEH	Vehículo
μg	Microgramo
μl	Microlitro

RESUMEN

La alta densidad de receptores muscarínicos M_1 en el hipocampo sugiere que el sistema colinérgico juega un papel importante en los procesos de memoria y aprendizaje. El objetivo de este trabajo fue sintetizar, en ausencia de solvente, dos análogos de la acetilcolina derivados del *p*-aminofenol y evaluar su afinidad y posible efecto alostérico sobre los receptores muscarínicos y sobre la amnesia inducida por escopolamina. Para este efecto se usó el laberinto elevado en forma de T y la prueba de aprendizaje por automoldeamiento. Ningún derivado desplazó la unión de la [3 H]N-metil-escopolamina ni alteró la afinidad por el carbacol. La amnesia inducida por escopolamina se bloqueó con la succinamida pero no con la succinimida en la prueba de aprendizaje por automoldeamiento. En el laberinto elevado en forma de T los dos derivados del *p*-aminofenol bloquearon el efecto de la escopolamina y además se observó que la succinimida facilitaba la adquisición de la memoria. Los efectos mencionados se observaron en ausencia de cambios en la locomoción o en la motivación para explorar.

ABSTRACT

The high density of M₁ muscarinic receptors in the hippocampus suggests that cholinergic system plays an important role for memory and learning processes. The objective of this work was to synthesize two analogues of acetylcholine derivative of *p*-aminophenol under solvent-free conditions, and to evaluate their affinity and possible allosteric effect on muscarinic receptors and on the scopolamine-induced amnesia. For the latter purpose, the elevated T-maze and autoshaping learning task were used. Any derivative inhibited [N-methyl -³H] scopolamine binding neither it modified carbachol affinity. The scopolamine-induced amnesia was blocked by the succinamide but not the succinimide in the autoshaping learning task. In the elevated T- maze both *p*-aminophenol derivatives blocked the effect of scopolamine, and it was also observed that the succinimide facilitated the memory acquisition. These mentioned effects were observed in absence of changes in motor activity or in the motivation to explore.

1. ANTECEDENTES

El evento común en la iniciación de la respuesta farmacológica es la formación de un complejo entre el ligando, molécula o fármaco y su sitio receptor. Ya que la mayoría de las respuestas farmacológicas están mediadas por receptores, el reconocimiento de la molécula por el receptor celular es el elemento crítico que determina la selectividad de la respuesta. El objetivo esencial en las investigaciones farmacológicas es identificar los pasos intermediarios en la respuesta y obtener una magnitud de la unión entre la formación del complejo fármaco-receptor y la respuesta funcional del órgano o célula. Lo más importante en la formación del complejo es la habilidad de la macromolécula para reconocer ligandos de una estructura particular, que tengan la selectividad necesaria tanto para la función fisiológica como para la actividad farmacológica. La caracterización estructural, la modificación de la estructura y la correlación estructural de un fármaco con su actividad farmacológica han formado las bases para la mayor parte de las investigaciones más recientes en farmoquímica (Kuntz, 1992; Schreiber, 2000).

El punto central en el diseño basado en la estructura es que un fármaco posea complementariedad estructural y química con su receptor. Los adelantos recientes en la química computacional, el análisis estructural de compuestos orgánicos y la medición bioquímica de las acciones primarias de los fármacos al nivel de sus receptores, han ampliado la cuantificación de las relaciones de estructura química y actividad biológica. Al mismo tiempo, su empleo ha mejorado el diseño de medicamentos. Métodos

similares basados en la estructura pueden utilizarse también para mejorar las propiedades farmacocinéticas de los productos medicamentosos. Los avances recientes en el empleo de estructuras de receptores y de complejos fármaco-receptor, por medio de la resolución estructural por empleo de cristalografía de rayos X o espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) son todavía más útiles en el diseño racional del ligando (Schreiber, 2000).

Si se conoce la base biológica de una enfermedad o de una alteración metabólica es posible diseñar un medicamento utilizando un mecanismo de aproximación al proceso patológico. Cuando este último se conoce a nivel molecular, es posible diseñar medicamentos que interactúen con la molécula responsable, de tal forma que la altere y se modifique el proceso patológico.

La muerte neuronal está involucrada en varias enfermedades neurodegenerativas entre las que se incluye la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington y varias neuropatías (Maccioni y cols., 2001). Dentro de estas enfermedades, una en las que se ha enfocado más la atención debido a su incidencia alta, es la EA. Aunque en su fisiopatología se han implicado diversos sistemas de neurotransmisión, el sistema colinérgico ha sido el más estudiado (Terry y Buccafusco, 2003).

La sinapsis colinérgica asegura su funcionalidad con la síntesis de acetilcolina (ACh) su unión a receptores muscarínicos (RM) y nicotínicos

(RN) presinápticos y postsinápticos, y su rápida hidrólisis catalizada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La colinoacetiltransferasa (CAT, enzima clave para la síntesis de ACh) sólo se deteriora en estadios muy avanzados de la enfermedad; posiblemente ésta es la causa de que el suministro de precursores (colina) no haya resultado terapéuticamente eficaz. Una estrategia que ha demostrado eficacia para detener el progreso de la EA es la encaminada a evitar la degradación de ACh, con el objetivo de contrarrestar su déficit cerebral. Así, fármacos que inhiben de forma reversible la AChE cerebral, como tacrina, donepecilo o galantamina, evitan la hidrólisis del neurotransmisor y de esta manera favorecen la elevación de los niveles de ACh en la hendidura sináptica y mejoran el déficit cognitivo de los pacientes con EA (Bachurin, 2003; Maccioni y cols., 2001).

Otra estrategia terapéutica consistiría en la aportación de agonistas y moduladores alostéricos de los RN neuronales y de los RM, ya que ahora se sabe se encuentran relacionados con procesos de neuroprotección, de memoria y de aprendizaje (Bachurin, 2003). Es bien conocido que los receptores M_1 en la corteza cerebral y en hipocampo juegan un papel importante en los procesos cognitivos (Fisher y cols. 2002; Levey, 1996; Van der Zee y Luiten, 1999). Estos hallazgos han llevado a la siguiente hipótesis: los agonistas que demuestren selectividad al subtipo M_1 podrían tener utilidad terapéutica mejorando la cognición en la EA. Además, los agonistas M_1 , pero no los inhibidores de AChE, incrementan los niveles de la proteína precursora de amiloide soluble y disminuyen el β -amiloide (Eglen y cols., 2001; Folder y cols., 2000). Sin embargo, la barrera que hay

que enfrentar con los agonistas muscarínicos es la de sus efectos adversos periféricos sobre el corazón, las glándulas y el músculo liso, ya que ha sido difícil sintetizar compuestos que demuestren selectividad al subtipo M₁.

Actualmente, las investigaciones se están enfocando hacia nuevos tratamientos que incrementen y mantengan la mejoría clínica de los pacientes con EA con fármacos que combinen más de un mecanismo de acción; tal es el caso de la galantamina, la cual además de inhibir a la AChE modula alostéricamente la actividad de los RN (Maelicke y cols., 2000).

2. INTRODUCCIÓN

A pesar de que Langley y Dale habían postulado ya el concepto de neurotransmisor químico a principios del siglo XX, fue Otto Loewi quien en 1921 demostró la existencia de un mediador químico al estimular la inervación autonómica del corazón de rana. Esta sustancia fue caracterizada químicamente en 1929 y se le denominó ACh, y resultó ser un éster de ácido acético y colina (Burgen, 1995)

La ACh fue el primer compuesto identificado como neurotransmisor de las sinapsis del sistema nervioso central (SNC). Actualmente se conoce que el sistema colinérgico está ampliamente distribuido tanto central como periféricamente, como lo muestran los estudios de inmunocitoquímica y autorradiografía dirigidos contra las enzimas que sintetizan y degradan al neurotransmisor, la CAT y la AChE, respectivamente (Eckenstein y cols., 1988; Van der Zee y Luiten, 1999; Wolf y cols., 1984).

Existen varios receptores para ACh clasificados en dos grandes grupos, muscarínicos y nicotínicos. Los primeros originan respuestas excitadoras o inhibitoras (en función del subtipo de receptor que activan) y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (metabotrópicos) y los segundos son siempre excitadores y forman parte de la familia de receptores ionotrópicos (Taylor, 2006).

2.1. QUÍMICA DE LA ACETILCOLINA

La ACh es la única amina transmisora de bajo peso molecular que no es un aminoácido y que no deriva directamente de uno de ellos.

La molécula de ACh puede adoptar diferentes conformaciones debido a la rotación sobre sus enlaces simples. Los ángulos torcionales pueden ocurrir alrededor de los enlaces τ_1 , τ_2 y τ_3 (**Fig.1**). Ya que los grupos metilos están dispuestos simétricamente alrededor de τ_3 y las restricciones están colocadas sobre τ_1 por el grupo acetoxi-planar, el ángulo de torsión más importante que determina la conformación en solución es el τ_2 . Una vista del grupo del carbono β -metileno de la molécula muestra las conformaciones alrededor de τ_2 . Estudios RMN indican que la conformación *gouche* es predominante en solución (Bikadi y Simonyi, 2003; Folder y cols., 2000; Taylor, 2006). Estudios de la actividad de análogos rígidos de ACh sugieren que la conformación *trans* puede ser la conformación activa sobre el RM, mientras que resultados de RMN y cristalografía por rayos X sugieren un cambio de conformación (*de gouche a trans*) cuando la ACh se une a su receptor muscarínico (Bikadi y Simonyi, 2003; Hulme, 2003).

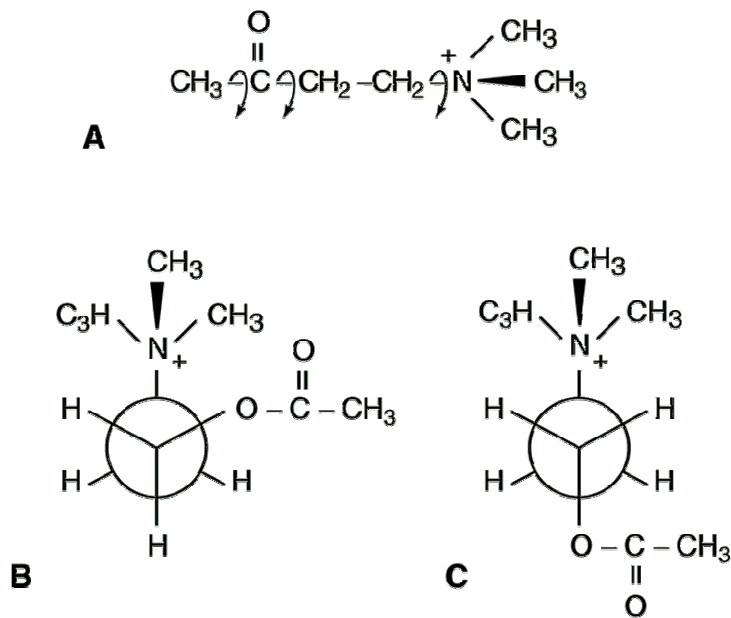


Figura 1. Estructura de la acetilcolina(A) Los tres ángulos de torsión τ_1 , τ_2 y τ_3 . (B) Proyección de Newman de la conformación gauche. (C) Proyección de Newman de la conformación trans.

2.2. SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE ACETILCOLINA

La ACh es el neurotransmisor empleado por las neuronas motoras de la médula espinal y por tanto se libera en las uniones neuromusculares de los vertebrados. En el sistema nervioso autónomo (SNA) es el transmisor de las neuronas preganglionares. Se emplea en numerosas sinapsis del encéfalo.

La ACh se sintetiza a partir de colina y acetilcoenzima A (acetilCoA) mediante una reacción catalizada por la CAT. El tejido nervioso no puede

sintetizar colina, por lo que ésta procede de la dieta. El cosustrato, la acetil CoA, participa en numerosas vías metabólicas generales y su presencia no está limitada a las neuronas colinérgicas. (**Fig. 2**)

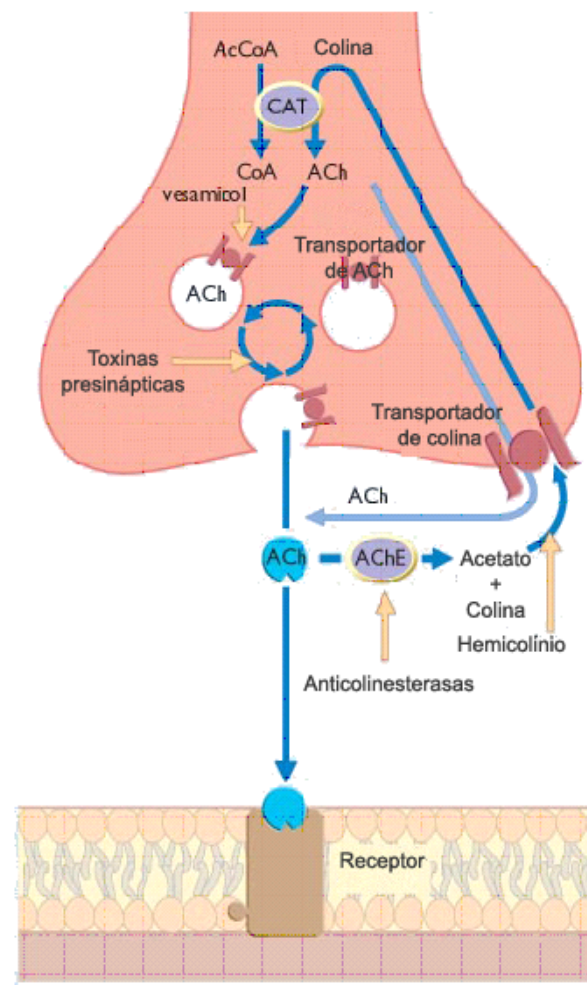


Figura 2. Neurotransmisión colinérgica.

La CAT se localiza en el SNC, específicamente donde tiene lugar la síntesis de ACh. La mayor actividad de la CAT se encuentra en el núcleo interpeduncular, el núcleo caudado, la retina, el epitelio coronal, el

hipocampo, la corteza cerebral y las raíces ventrales de la médula espinal; se sintetiza en el soma neuronal y viaja a lo largo del axón, posiblemente unida a los neurotúbulos, que actúan como transportadores; sin embargo, también se ha señalado la síntesis de esta proteína en los axones y botones terminales. En las terminales colinérgicas el neurotransmisor es sintetizado en el citoplasma, de donde puede ser liberado directamente al espacio sináptico, o bien, ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para ser liberado por exocitosis (Taylor, 2006).

La ACh contenida en vesículas es liberada al exterior al fusionarse la membrana vesicular con la membrana de la terminal presináptica. Este mecanismo está constituido por varias etapas; primeramente, las vesículas transportan el neurotransmisor a su interior mediante una proteína transportadora con 12 dominios transmembranales, que utilizan un gradiente electroquímico generado por una bomba ATPasa de protones (H^+). La mayor parte de las vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor no están libres en el citoplasma sino que se encuentran unidas al citoesqueleto de la terminal presináptica mediante la interacción de proteínas presentes en la membrana de la vesícula (sinapsinas I y II) con proteínas del citoesqueleto (Südhof, 1995; Taylor, 2006). Característicamente, las sinapsinas son fosforiladas por diversas cinasas, que incluyen las CAM cinasa I y CAM cinasa II, dependientes de iones de Ca^{2+} y de la calmodulina, y por la cinasa dependiente de AMPc (PKA).

La propagación de un impulso nervioso hacia la terminal axónica, despolariza la terminal, llevando su potencial desde -70 mV hasta $+20$ ó

+30 mV, lo que permite la apertura de canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje, particularmente aquellos que se abren en el rango de -20 a 0 mV (canales de alto umbral, que incluyen los tipos L, N, P y Q). La apertura de estos canales permite que en su vecindad se formen zonas de alta densidad de Ca^{2+} (Südhof ,1995). Debido al gradiente electroquímico se genera un influjo de iones de Ca^{2+} , el aumento en su concentración afecta a diversas proteínas, entre ellas, aquellas involucradas en la exocitosis. El Ca^{2+} junto con la calmodulina activan las cinasas CAM I y CAM II, las que a su vez fosforilan a la sinapsina I y a la sinapsina II. La adición de un grupo fosfato a las sinapsinas debilita la unión de las vesículas sinápticas al citoesqueleto, facilitando así su transporte a la zona activa donde experimentan un proceso donde una proteína, la sinaptotagmina (que parece funcionar como un sensor de Ca^{2+}), termina de manera súbita el proceso de fusión de la vesícula una vez que se han formado complejos de proteínas, como la sintaxina, la SNAP-25, el factor sensible a N-etilmaleimida (FSN) y proteínas de unión a FSN o SNAPs (Südhof ,1995).

La ACh liberada al espacio sináptico actúa sobre sus receptores, o puede ser hidrolizada por acción de la AChE. Lo anterior permite la inducción de cambios bioquímicos y eléctricos en la célula postsináptica, que dependen del tipo de receptor y de la forma en que éste se encuentre sincronizado con los sistemas de transducción de señal.

2.3. ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO COLINÉRGICO

2.3.1. RECEPTORES A ACETILCOLINA

2.3.1.1. Receptores muscarínicos

Estos receptores pertenecen a la denominada superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (receptores metabotrópicos); todos son receptores de membrana con una estructura común, con siete dominios transmembranales y los extremos amino y carboxilo terminal, fuera y dentro de la membrana, respectivamente (Caulfield y Birdsall 1998; Taylor, 2006; Wess, 1995). El tercer bucle intracelular es el más largo y constituye el nexo de unión con las proteínas G, cuyo acoplamiento es necesario para la activación de los mecanismos efectores. Estudios con mutagénesis dirigida sugieren que el sitio de unión de la ACh consiste en una serie de aminoácidos hidrofóbicos localizados en la mitad superior de los dominios transmembrana III, V, VI y VII (Hulme y cols., 2003; Wess, 1995) (**Fig. 3**).

Es bien conocido que los receptores muscarínicos contienen un sitio primario (sitio ortostérico), donde se unen la ACh, agonistas y antagonistas. Además, estos receptores tienen uno o más sitios alostéricos que regulan los efectos de varios agentes sobre la unión del ligando al sitio ortostérico. La unión de los ligandos a sitios alostéricos altera la afinidad con la cual los ligandos muscarínicos se unen al sitio primario de unión en el receptor. El efecto de cooperatividad de un agente alostérico depende del ligando primario con el cual interactúa y puede ser positiva, negativa o neutral. Si es neutral, el agente alostérico se une al receptor sin afectar la afinidad del

ligando primario (Caulfield y Birdsall, 1998; Christopoulos, 2002; Hulme y cols., 2003; Tuček y Proška, 1995).

Los RM se han clasificado farmacológicamente en cinco subtipos conocidos como M₁-M₅ (Caulfield y Birdsall, 1998; Hulme y cols., 1990). Los receptores M₁, M₃ y M₅ se acoplan a la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana a través de las proteínas G_{αq}, generando inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol como segundos mensajeros lo cual moviliza Ca²⁺. Los receptores M₂ y M₄ se encuentran asociados a proteínas G_{αi} con lo que inhiben la formación de AMPc. Asimismo, los RM pueden regular conductancias rectificadoras de K⁺ y corrientes de Ca²⁺ (Caulfield y Birdsall, 1998; Taylor, 2006).

La expresión de los RM en el cerebro de mamíferos es muy amplia; sin embargo, entre los núcleos que presentan una mayor densidad de estas proteínas están la neocorteza, el hipocampo, el neostriado, la base del cerebro anterior y el tálamo (Rouse y cols., 1999; Van der Zee y Luiten, 1999;). Además, a través de estudios de inmunocitoquímica, unión de radioligando y de hibridación *in situ* se ha identificado que en el hipocampo de la rata se expresan los cinco subtipos de receptores, siendo el más abundante el subtipo M₁ (Levey, 1996; Oki y cols., 2005; Van der Zee y Luiten, 1999).

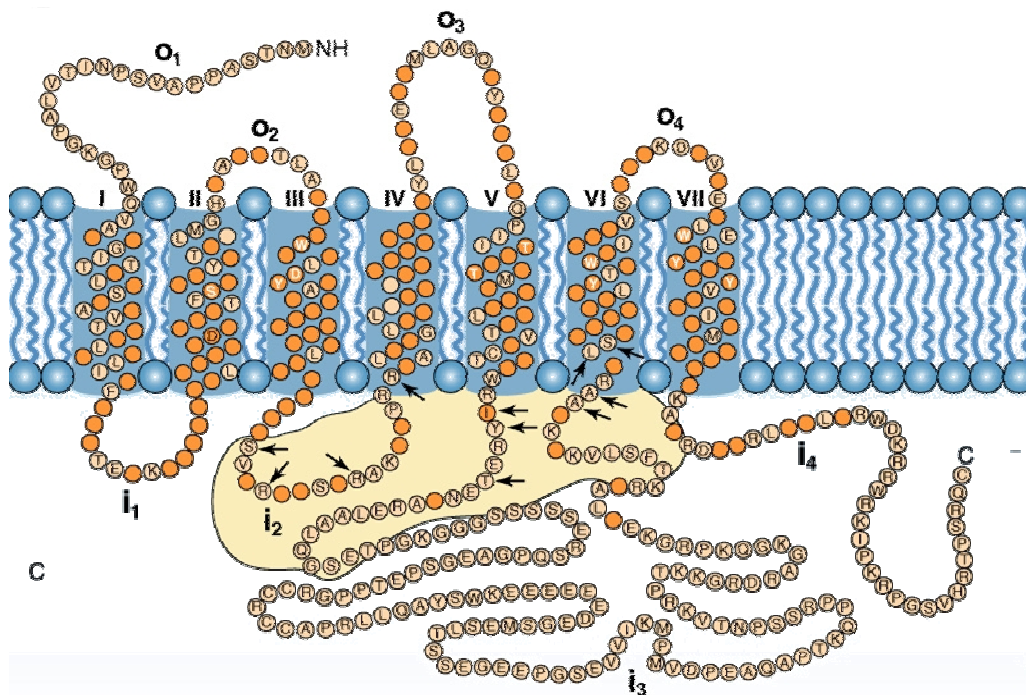


Figura 3. Estructura transmembranal y secuencia de aminoácidos del receptor muscarínico M_1 humano. Los aminoácidos que están involucrados en la unión de agonistas y antagonistas están señalados en letras blancas. El área sombreada representa la región aproximada que determina el acoplamiento con la proteína G. Las flechas señalan los aminoácidos que se sabe son importantes para el acoplamiento con la proteína G específica.

Los RM están involucrados en la actividad locomotora extrapiramidal y procesos cognitivos, tal como la memoria y el aprendizaje. La distribución diferente de los subtipos de receptores muscarínicos en el cerebro sugiere que el subtipo M_1 puede ser particularmente importante para el proceso cognitivo, ya que este receptor es el más abundante en áreas del cerebro anterior donde las sinapsis colinérgicas parecen mediar la adquisición y almacén de información nueva (Levey, 1996; Van der Zee y Luiten, 1999).

2.3.1.2. Receptores nicotínicos

Los RN son complejos pentaméricos ionotrópicos que forman un poro transmembranal de ~650 pm de diámetro que sirve como canal para cationes pequeños como el Na^+ , principalmente. La entrada de Na^+ a la célula, debida al gradiente electroquímico, produce despolarización de la membrana y origina potenciales excitadores rápidos, de tal manera que los RN expresados en terminales neurales facilitan la liberación de neurotransmisores, y aquellos expresados en la somata participan en la transmisión rápida (McDermot y cols., 1999; Taylor, 2006). (**Fig. 4**)

En la unión neuromuscular, los RN están constituidos por dos subunidades α , una β , una γ , y una δ . Cada una de estas subunidades tiene una estructura con cuatro dominios transmembranales. Los sitios de unión de la ACh se encuentran en la subunidades α , que tienen dos residuos de cisteína próximos entre sí y necesarios para el reconocimiento del agonista (Taylor, 2006).

Los RN cerebrales están constituidos solamente por subunidades α y β . Existen dos grupos grandes de RN neuronales, que se definen con base en la capacidad inhibitoria del veneno de la cobra (*Bungarus multicinctus*), la α -bungarotoxina, y la capacidad agonista de la epibatidina, poderoso neurotóxico aislado de la piel de la rana ecuatoriana *Epidobates tricolor*. El primer grupo de los RN neuronales está constituido exclusivamente por subunidades α_7 y α_8 , que son los únicos que pueden ser homopentámeros y se reconocen por ser inhibidos por la α -bungarotoxina y no ser

susceptibles de activación por epibatidina (Deneris y cols. 1991; Gotti y cols., 1997).

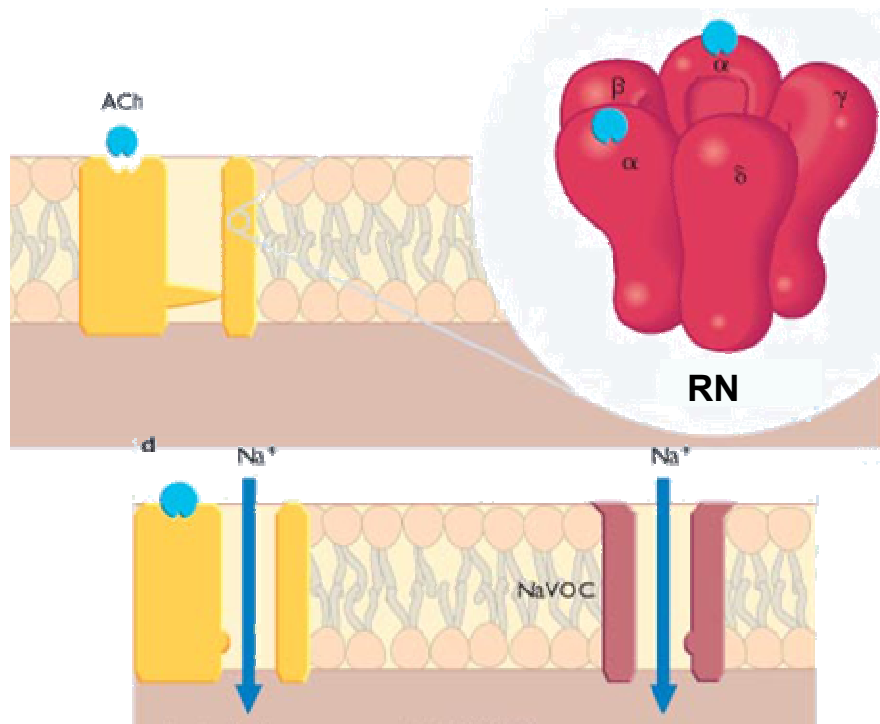


Figura 4. Estructura transmembranal del receptor nicotínico. Los RN son complejos pentaméricos que forman un poro transmembranal constituidos por subunidades α , β , γ , y δ .

Los receptores α_7 , son los más abundantes y su presencia ha sido descrita en sistema nervioso periférico en ganglios simpáticos y parasimpáticos, y la lámina X de la médula espinal. En el SNC este receptor tiene una amplia distribución: tálamo, estriado, núcleo accumbens, núcleo geniculado lateral, hipocampo, corteza prefrontal. En muchos de estos sitios se ha conseguido

demostrar que tiene una localización presináptica. Esta localización, junto con el dato de que su permeabilidad a Ca^{2+} es la mayor de todos los RN, puede explicar su función, facilitando o induciendo la secreción de ACh y de otros neurotransmisores (glutamato y noradrenalina) (McDermot y cols, 1999; Mier y cols. 1999).

El segundo grupo de receptores neuronales es insensible a la inhibición por la α -bungarotoxina y activado por epibatidina. Es un grupo heterogéneo de receptores donde pueden intervenir las subunidades α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , y α_6 , y las subunidades β_2 , β_3 y β_4 . La subunidad α_4 está ampliamente distribuida en el estriado, donde ejerce un poderoso control de la secreción de dopamina. El incremento de la liberación de GABA de las interneuronas del tálamo y del cerebro medio, así como la liberación de noradrenalina del locus ceruleus, están bajo el control de RN presinápticos del tipo $\alpha_4\alpha_2$ (Deneris y cols., 1991; Gotti y cols., 1997).

2.3.2. VÍAS CEREBRALES COLINÉRGICAS

La distribución y morfología de las neuronas colinérgicas es muy variada. (**Fig. 5**). Las que tienen axones cortos se pueden considerar como interneuronas, son muy abundantes en el estriado, donde establecen una estrecha relación funcional con las neuronas dopaminérgicas, cuyas terminales son muy abundantes en esta zona. Los núcleos de los pares craneales tienen también interneuronas colinérgicas abundantes, lo mismo que en toda la médula espinal (Van der Zee y Luiten, 1999; Woolf , 1991).

Las vías colinérgicas con axones largos tienen una localización más difusa que las aminérgicas, y no siempre sus cuerpos celulares se corresponden con núcleos definidos. La vía colinérgica que sale de la base del cerebro anterior, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el septum, la banda diagonal de Broca, pallidum ventral y, sobre todo, el núcleo basal de Meynert, se extiende hasta el bulbo olfativo, corteza, amígdala e hipocampo, quedando bajo su influencia toda la vía del sistema de recompensa cerebral (Mesulam, 1995; Van der Zee y Luiten, 1999).

Una segunda vía colinérgica, con axones largos, tiene sus cuerpos neuronales localizados más caudalmente, en la zona del mesencéfalo y del núcleo tegmental lateral, en el piso del cuarto ventrículo. Los axones de este sistema inervan el tálamo, hipotálamo, prácticamente todos los núcleos del cerebro medio, la habénula, etc (Van der Zee y Luiten, 1999).

2.3.2.1. El sistema colinérgico del cerebro anterior

Tres regiones colinérgicas blanco del sistema colinérgico del cerebro anterior están íntimamente involucradas en las funciones cognitivas: el hipocampo, la neocorteza y la amígdala (Van der Zee y Luiten, 1999; Woolf, 1991,1996). La neocorteza y la amígdala están colinérgicamente inervadas por el núcleo basal magnocelular (NBM, en primates y en humanos corresponde al núcleo basal de Meynert), mientras que el

hipocampo recibe la inervación colinérgica del complejo de la banda diagonal y el septum medial (BD-SM) (Woolf, 1991, 1996).

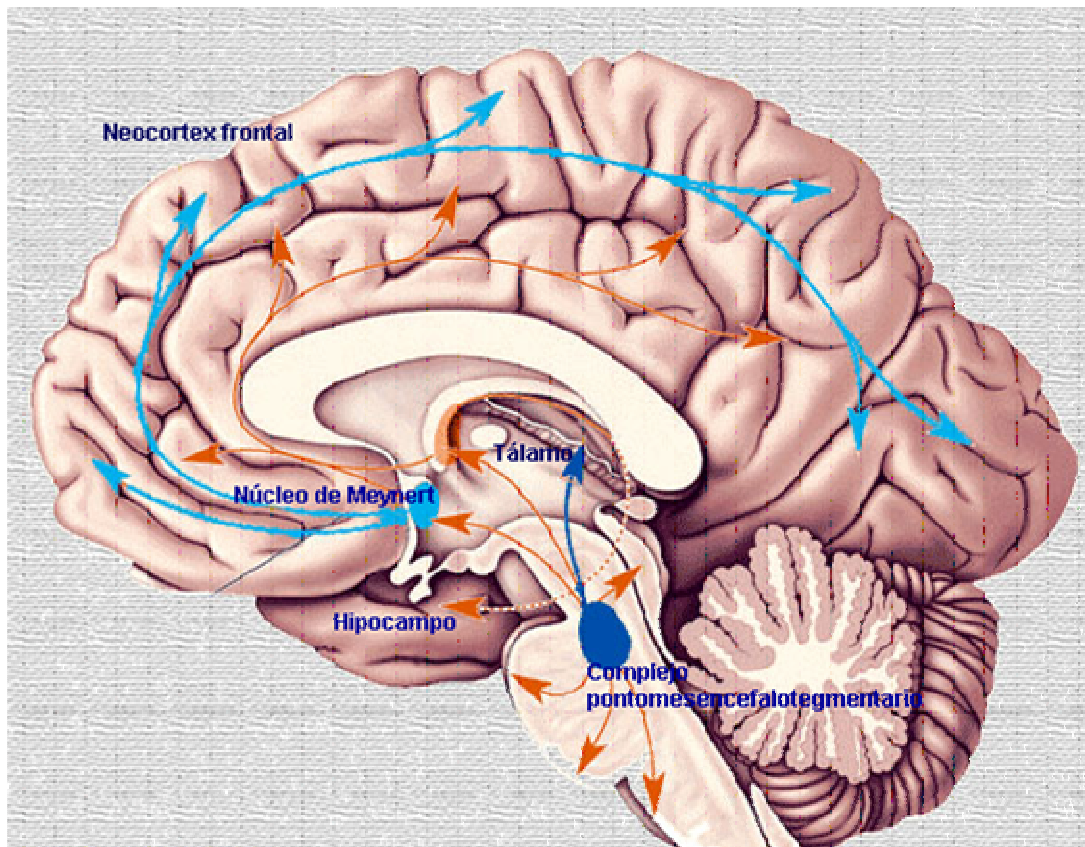


Figura 5. Sistema colinérgico central y sus proyecciones. El sistema colinérgico ha sido visto como una red neuronal general que comprende áreas colinérgicas del cerebro anterior (el complejo de la banda diagonal del septo medial y el núcleo basal magnocelular), las interneuronas del estriado y las células colinérgicas de áreas pontomesencefálicas.

2.3.2.1.1. Núcleo basal magnocelular (NBM)

Las neuronas colinérgicas del NBM constituyen una agregación de células multipolares grandes con árboles dendríticos extensos (Bigl y Arendt, 1991; Woolf, 1991). Durante el desarrollo filogenético del cerebro se observa una diferenciación marcada y progresiva en el NBM. Esta progresión del NBM se correlaciona con el grado de cerebralización (p.ej. el desarrollo de la corteza), e implica la importancia de la neurotransmisión colinérgica en procesos neocorticales (Van der Zee y Luiten, 1999). Dentro del NBM, las interneuronas gabaérgicas son frecuentemente inervadas por neuronas colinérgicas (Martínez-Murillo y cols., 1990). Las neuronas colinérgicas del NBM dan origen a la entrada colinérgica principal a la corteza. Además, el NBM inerva a la amígdala basolateral, lateral y basomedial y al bulbo olfatorio (Bigl y Arendt, 1991; Woolf, 1991). La topografía de la inervación colinérgica de la neocorteza está básicamente organizada en un gradiente rostrocaudal, ventrodorsal y mediolateral (Bigl y cols., 1982; Bigl y Arendt, 1991; Woolf, 1991). La densidad de las terminales colinérgicas difiere entre las seis capas y depende de la región cortical estudiada (Eckenstein y cols., 1988). Los botones colinérgicos forman sinapsis principalmente con astas dendríticas, muy pocas con espinas dendríticas y solo ocasionalmente con el somata neuronal (Van der Zee y Luiten, 1999).

2.3.2.1.2. Complejo de la banda diagonal- septum medial (BD-SM)

Las neuronas colinérgicas del complejo de la BD-SM forman una columna de células multipolares con siete o diez dendritas primarias observables que radian a múltiples direcciones (Woolf, 1991). Las neuronas colinérgicas del septum medial (SM) de axones colaterales inervan neuronas colinérgicas y no colinérgicas. El complejo del BD-SM proyecta a estructuras relacionadas con el olfato, el hipocampo y el parahipocampo, y la corteza prefrontal medial, cingulata y retroesplenial (Gaykema y cols., 1991). Las fibras colinérgicas que se originan del complejo BD-SM corren a través de la fimbria-fornix y terminan en el hipocampo. Estas fibras se encuentran en todas las capas de la formación hipocampal, pero son más numerosas en la vecindad de las capas celulares donde ellas forman una red tridimensional alrededor de los cuerpos celulares de las células piramidales y granulares. La inervación colinérgica del complejo BD-SM termina en los tipos celulares principales del hipocampo, es decir, las piramidales, granulares y en las interneuronas. Las terminales colinérgicas establecen sinapsis con astas y espinas dendríticas y cuerpos celulares de las neuronas del hipocampo. Las terminales colinérgicas sobre neuronas gabaérgicas se observan frecuentemente en el hipocampo (Léránth y Frotscher, 1987).

Las neuronas del SM son activadas por aplicación iontoforética de ACh o carbacol, indicando su naturaleza colinérgica (Segal, 1986). Basándose en manipulaciones colinérgicas del *ritmo theta* hipocampal, aparentemente los RM están involucrados en la neurotransmisión colinérgica del SM

(Monmaur y cols., 1994). Los resultados de Moore y cols. (1995) sugieren que las fibras colinérgicas (las colaterales en el SM y las fibras que terminan en el hipocampo) tienen autorreceptores muscarínicos, lo cual ejerce un control inhibitorio sobre la liberación de ACh. Es probable que las neuronas gabaérgicas y colinérgicas formen un grupo interconectado de células con actividad de disparo sincronizadas (células marcapasos *theta*) (Vertes y Kocsis, 1997). Esta sincronización puede ser modulada por la actividad de las células colinérgicas por sí mismas a través de la acción de ACh liberada sobre RM del SM. Los RM expresados por células colinérgicas podrían ser usados presinápticamente en las sinapsis GABA-ACh donde regulan la liberación de ACh de estas terminales, ya que el bloqueo de RM en el SM y en la banda diagonal reduce la liberación de ACh inducida por K^+ . Se ha sugerido que aunque tanto las células gabaérgicas como las colinérgicas en el SM son células marcapasos, sólo la entrada rítmica de células colinérgicas es abolida por antagonistas colinérgicos (Metcalf y cols., 1988).

2.3.3. FUNCIONES DE LA ACETILCOLINA MEDIADAS POR RECEPTORES MUSCARÍNICOS

La ACh está distribuida ampliamente a través del SNC y su concentración muestra gran variación regional con una diferencia de 10 veces entre las regiones más altas (p.ej. tubérculo olfatorio, estriado, núcleos interpedunculares) y las más bajas (p.ej. cerebelo). Los efectos fisiológicos de la ACh tienen una latencia de inicio de décimas de milisegundos

(efectos primariamente mediados a través de RN) a minutos (efectos mediados por RM). Es por esta razón que la ACh ha sido considerada como un modulador más que un neurotransmisor en el SNC (Van der Zee y Luiten, 1999).

Los RM regulan tres eventos celulares diferentes: conductancias de canales iónicos, metabolismo de nucleótidos cíclicos y generación de IP_3 y diacilglicerol. El IP_3 y sus subsecuentes cambios en la actividad de PKC, juegan un papel importante en el procesamiento de las señales neurales y en la modulación a corto y a largo plazo de la transmisión sináptica. Consecuentemente, este sistema de segundo mensajero está implicado en las acciones mediadas por RM en los procesos de memoria y aprendizaje (Van der Zee y Luiten, 1999).

La potenciación a largo plazo (PLP) hipocampal es un modelo celular de memoria y aprendizaje (Lynch, 2004). Shinoe y cols. (2005) mostraron que el aumento en la PLP es inducida por activación fisiológica de RM. Ellos encontraron que una concentración baja de carbacol, así como la liberación endógena de ACh por estimulación repetida de fibras colinérgicas, aumenta la PLP en la región CA1 del hipocampo. Ya que la PLP en la región CA1 es inducida y expresada postsinápticamente, los autores propusieron que el aumento de la PLP por la activación de RM era probablemente mediada por RM postsinápticos. Tomando en cuenta que en el hipocampo los receptores M_1 y M_3 son expresados abundantemente en el sitio postsináptico, y que el receptor M_1 muestra la expresión más fuerte en la región CA1 entre todos los subtipos, utilizaron ratones

mutantes carentes del receptor M_1 o del receptor M_3 encontrando que la inducción de la PLP hipocampal estuvo ausente en los mutantes carentes del RM M_1 pero no en los mutantes carentes del receptor M_3 . Finalmente, los autores concluyeron que la modulación fisiológica de la PLP por la ACh probablemente este implicada en la facilitación de la formación de la memoria en el hipocampo y que el receptor M_1 juega un papel importante en este proceso.

2.4. MEMORIA Y APRENDIZAJE

2.4.1. MEMORIA

Aprendizaje y memoria se refieren a diferentes aspectos del mismo fenómeno neuroplástico: el *aprendizaje* consiste en la inducción de cambios relacionados con la conducta como consecuencia de la experiencia, y la *memoria* consiste en el mantenimiento y posterior expresión de los cambios conductuales (Kandel, 2001b).

El proceso de memoria tiene diferentes fases, que consisten en la memoria a corto plazo, la memoria reciente y la memoria a largo plazo. La memoria a corto plazo parece depender del mantenimiento de la actividad neural, pues se interrumpe fácilmente (por ejemplo, con la anestesia). La memoria reciente alude al proceso por el cual la información de la memoria a corto plazo se transforma a memoria de largo plazo. Este proceso parece depender de la transmisión de la actividad por el hipocampo, pues su lesión y la de sus estructuras relacionadas impiden la consolidación de la

memoria a corto plazo en memoria a largo plazo. La memoria a largo plazo aparentemente está en función de los cambios permanentes producidos en grupos de neuronas de distribución amplia. Estos cambios pueden incluir variaciones tanto morfológicas como funcionales (Byrne, 1997). Además del almacenamiento de memoria, deben existir mecanismos para acceder a estos depósitos, recuperar la información, devolverla a la conciencia, compararla con otras informaciones y utilizarla para tomar decisiones.

Por otra parte, basándose fundamentalmente en estudios neuropsicológicos con pacientes amnésicos, una forma útil de clasificar a la memoria es en memoria explícita (declarativa) e implícita (procedimental). Se entiende por *memoria explícita* a procesos de adquisición de habilidades o información que al recordarlas el sujeto lo hace de forma deliberada y consciente. En contraste, la *memoria implícita* se refiere a la forma no intencional, ni controlada por el sujeto de recordarlas (Rugg y cols. 1998).

2.4.2. APRENDIZAJE

Adoptando un criterio pragmático basado en los contenidos que originan una experiencia de aprendizaje se pueden englobar tres variedades de procesos de aprendizaje: aprendizaje conductual, aprendizaje de habilidades y adquisición de información (Gómez-Pérez y cols., 2003).

En el proceso de *aprendizaje conductual* se distingue el aprendizaje asociativo y el no asociativo, dependiendo del cambio conductual provocado por la experiencia repetida de dos eventos o estímulos que aparecen relacionados en el tiempo (aprendizaje asociativo) o a la simple repetición de un único evento o estímulo (no asociativo).

El proceso de *adquisición de habilidades* engloba diferentes tipos de habilidades o procedimientos para hacer algo y se refieren a tres ámbitos: el motor, el perceptivo y el cognitivo. El aprendizaje motor abarca desde destrezas complejas hasta los hábitos simples. El aprendizaje perceptivo permite que a través de la experiencia repetida con estímulos complejos la adquisición de destrezas discriminatorias permita distinguir entre estímulos muy similares. Por otra parte, el aprendizaje cognitivo incluye a los procedimientos y operaciones mentales que aplicamos constantemente y sin esfuerzo aparente.

Por medio del proceso de *adquisición de información* nuestro cerebro adquiere del entorno información que, cuando es registrada en la memoria, pasa a formar parte de nuestro conocimiento del entorno.

2.4.2.1. Aprendizaje asociativo

La asociación entre objetos, situaciones o individuos es uno de los mecanismos fundamentales del aprendizaje y la memoria, que representan

un mecanismo para la modificación adaptativa de la conducta y la adquisición del conocimiento (Kandel, 2001a).

Existen dos formas de aprendizaje asociativo, una que repercute en la conducta del sujeto (aprendizaje asociativo conductual) y otra cuyo efecto es la incorporación de nuevas asociaciones entre representaciones mentales que pueden referirse a objetos o rasgos de los mismos (aprendizaje asociativo cognitivo).

El *aprendizaje asociativo conductual* se ha estudiado en varias especies mediante técnicas de condicionamiento pavloviano (condicionamiento clásico) e instrumental (condicionamiento operante).

A. El condicionamiento pavloviano o clásico es la forma de aprendizaje asociativo que permite a los animales aprender a anticiparse a eventos o estímulos biológicamente relevantes mediante el aumento de las señales indicativas o predictivas de los mismos (estímulo condicionado, EC). El aumento de la relación entre señales y consecuencias permite que conductas reflejas, que inicialmente son provocadas por un conjunto de estímulos (estímulo incondicionado, EI), sean provocados después del condicionamiento por señales inicialmente neutras, de modo que ahora el animal ante el EC actúa de forma anticipada en suposición de la aparición del EI (respuesta condicionada, RC) (Clark y cols. 2002; Kandel, 2001a; Milner, 1998).

B. El aprendizaje instrumental u operante permite al animal adquirir conductas que producen consecuencias benéficas o dañinas a partir de su comportamiento, ya sea para obtener una recompensa como alimento (reforzador positivo) o le permitan escapar o evitar situaciones peligrosas (reforzador negativo) (Kandel, 2001a).

El *aprendizaje asociativo cognitivo* permite adquirir información acerca de las relaciones entre diversos sucesos del entorno al actuar como un mecanismo básico para la detección de relaciones de dependencia entre sucesos y predecir consecuencias probables a partir de antecedentes. Es decir, a través de la asociación es posible aprender relaciones predictivas entre señales y consecuencias lo que permite realizar juicios predictivos acerca de la probabilidad que un determinado suceso pueda ser establecido por su antecedente, así como relaciones de causalidad entre nuestra propia conducta (Aguado, 2001).

2.4.2.2. Aprendizaje de tipo auto-moldeamiento

El concepto de *moldeamiento de la respuesta* (proceso por el cual se modifica o moldea el comportamiento del animal) fue introducido por Burrhus Frederic Skinner en 1957. Skinner es famoso por desarrollar una cámara experimental llamada “caja de Skinner” para el estudio de la conducta en ratas o palomas. Con sus investigaciones él propuso que se puede establecer un nuevo comportamiento o alterar uno existente por medio de moldear tal conducta al entregar un reforzador (por ejemplo,

alimento) de forma gradual ante conductas que se aproximen a una forma deseada.

Una alternativa que hace más fácil entender el concepto de *moldeamiento* fue desarrollada por P.L. Brown y H.M. Jenkins en 1968. Ellos entrenaron durante varios ensayos a un animal hambriento en una caja experimental equipada con una tecla o palanca iluminada por varios segundos y seguida por la entrega de alimento. Observaron que si la entrega del alimento se realiza al final de la presentación del periodo de la tecla iluminada, momento en que los animales no tienen por que picarla, los animales empezaban a picarla. Es decir, se auto-enseñaban a responder a la tecla y su comportamiento es la resultante de la tecla seguida por la entrega de comida. De esta manera, el *auto-moldeamiento* ocurre cuando el estímulo produce algún comportamiento específico de la especie debido a su asociación a un reforzador.

El auto-moldeamiento, es un ejemplo de aprendizaje asociativo y condicionamiento clásico observado en muchas especies y que se emplea para el estudio de los procesos de memoria y aprendizaje. Cuando en el auto-moldeamiento se combina el condicionamiento clásico (asociación estímulo-estímulo, E-E) y el condicionamiento instrumental (asociación estímulo respuesta, E-R), a partir de la interacción de los estímulos ambientales y respuestas, se forman representaciones cognitivas (Meneses, 2003).

Ya que la palanca o tecla iluminada es un EC que predice el EI, y el animal está dando una RC al picotear o presionar el EC, se demuestra que los animales emiten la primera RC como resultado de la asociación E-E e independientemente de su propia conducta. Posteriormente, la asociación instrumental (E-R) tiende a hacer más regular la ocurrencia de la RC en la medida que ésta se relaciona con la entrega contingente de comida o EI. Por lo tanto, se puede postular que la primera RC se da después de aprender una relación E-E y el mantenimiento de la RC se debe al aprendizaje de la relación R-E (Meneses, 2003; Kandel, 2001a).

2.5. MODELOS CELULARES DE MEMORIA Y APRENDIZAJE

Existen dos líneas de investigación relevantes que representan el enfoque de los modelos más simples para entender las bases neuronales de la memoria y el aprendizaje. La primera de ellas se ocupa de las bases neuronales del desarrollo y la memoria de *Aplysia californica*, un caracol marino, cuyo reflejo de retracción de la branquia puede someterse a formas simples de aprendizaje no asociativo y asociativo. La segunda se encarga de la PLP, fenómeno relacionado con el aprendizaje y la memoria que tiene lugar en el encéfalo de los mamíferos (Kandel, 2001b)

2.5.1. APRENDIZAJE EN EL CIRCUITO REFLEJO DE RETRACCIÓN DE LA BRANQUIA EN LA *APLYSIA*

El sifón de la *aplysia* consiste en un pequeño canal carnosos utilizado para expulsar agua de mar y desechos. Cuando se toca el sifón, tanto éste como la branquia adyacente se retiran bajo un manto protector. Esta respuesta al tacto se denomina *reflejo de retracción de la branquia de la aplysia* (Lattal y Abel, 2000; Kandel, 2001b).

El circuito nervioso que media este reflejo es relativamente simple. La piel del sifón contiene 34 neuronas sensoriales que establecen la sinapsis con seis neuronas motoras, responsables de retraer el sifón y la branquia. Asimismo, las neuronas sensoriales activan interneuronas que, a su vez, establecen sinapsis con las neuronas motoras (Kandel, 2001b).

La habituación consiste en la reducción gradual de la fuerza de la reacción conductual ante un estímulo que se presenta de forma repetida. Así, si se toca el sifón de la *aplysia* cada 30 segundos, el reflejo de retracción es cada vez menos vigoroso (Kandel, 2001b).

La habituación se relaciona con el descenso del número de potenciales de acción que provoca cada contacto con el sifón en las neuronas motoras de la branquia. Durante la habituación el número de vesículas con neurotransmisor de las neuronas motoras no se reduce, por lo que se concluye que lo que se reduce es el número de potenciales de acción en

dichas neuronas, lo cual provocaba a su vez una disminución en la liberación de neurotransmisores en las mismas.

Con las correspondientes investigaciones se determinó que el descenso en la liberación de neurotransmisor, en las neuronas sensoriales del sifón durante la habituación al reflejo de retracción de la branquia, es en parte el resultado de la disminución del número de iones Ca^{+2} que entra en los botones terminales de las neuronas sensoriales del sifón en respuesta al potencial de acción (Lattal y Abel, 2000).

De esta manera surgió la teoría del aprendizaje de la habituación del reflejo de la branquia en la *aplysia*. Cuando se provoca de forma repetida el reflejo de retracción de la branquia, cada contacto con el sifón sigue activando completamente las neuronas sensoriales, que envían la misma descarga completa de potenciales de acción a lo largo de sus axones. Sin embargo, debido a que entran menos iones Ca^{+2} en las terminales sinápticas en respuesta a cada descarga sucesiva de potenciales de acción, y a que las reservas de neurotransmisor se reducen parcialmente, se libera cada vez menos neurotransmisor desde las neuronas sensoriales a las sinapsis, se provocan cada vez menos potenciales de acción en las neuronas motoras, y se vuelve cada vez más débil la contracción del músculo de la branquia en respuesta a cada contacto con el sifón. La sensibilización consiste en el aumento general de la respuesta de un animal a los estímulos que aparecen después de un estímulo nocivo. En la branquia de la *aplysia* la sensibilización dura varios minutos una vez que se ha estimulado intensamente su cola. Se ha demostrado que la sensibilización se debe a

un aumento en la cantidad de neurotransmisor liberado por las neuronas sensoriales del sifón en respuesta a sus propios potenciales de acción (Lattal y Abel, 2000). El mecanismo por el cual se produce esto es la facilitación presináptica. Las fibras sensoriales que salen de la cola de la *aplysia* establecen sinapsis con los botones de las neuronas sensoriales del sifón. A través de estas neuronas serotoninérgicas, la estimulación intensa de la cola produce cambios en los botones de las neuronas sensoriales, de forma que cada potencial de acción que llega al sifón da lugar a una entrada mayor de iones de Ca^{+2} y a una liberación mayor de neurotransmisor hacia las neuronas motoras.

La aplicación *in vitro* de serotonina a la sinapsis sensorimotoras de la *aplysia* produce sensibilización, que dura desde varios minutos a varios días. El circuito de retracción de la branquia de la *aplysia* puede someterse a un condicionamiento pavloviano. Si se empareja un ligero contacto del sifón (EI) con un golpe fuerte en la cola (EC) cada pocos minutos durante varios ensayos, el propio contacto ligero comienza a provocar una respuesta enérgica de retracción de la branquia, parecida a la que provoca el golpe fuerte en la cola. Normalmente la respuesta incondicionada se mantiene durante varios días después de veinte ensayos de condicionamiento. Se ha propuesto un modelo para explicar el condicionamiento pavloviano (Lattal y Abel, 2000; Kandel, 2001b).

Al igual que la sensibilización, se supone que el condicionamiento pavloviano del reflejo de retracción de la branquia de la *aplysia*, está mediado por la acción de interneuronas que se activan por la estimulación

de la cola sobre las neuronas sensoriales que normalmente activan el reflejo. Sin embargo el condicionamiento pavloviano depende de la relación temporal que existe entre la activación de la interneurona por la sacudida y la activación de la neurona sensorial por el EC.

Los segundos mensajeros pueden inducir cambios duraderos en la estructura y función nerviosa de diversas formas, así se les ha involucrado en el almacenamiento de memoria. Un ejemplo de segundo mensajero es el AMP cíclico, que desempeña una función de sensibilización del reflejo de retracción de la branquia en la *aplysia*. El AMPc activa otra enzima, la PKA, que hace que se cierren canales de K^+ en los botones, lo cual provoca un aumento en la duración de los potenciales de acción, que a su vez da lugar a un aumento de la entrada de los iones Ca^{+2} , y por lo tanto, de la liberación de neurotransmisor en respuesta al contacto con el sifón (Kandel, 2001b).

Las investigaciones realizadas sobre el aprendizaje con el reflejo de retracción de la branquia en la *aplysia* indican que los recuerdos a largo plazo y a corto plazo se almacenan en las mismas sinapsis, aunque su forma de almacenamiento es diferente.

2.5.2. POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO (PLP) EN EL HIPOCAMPO

La PLP consiste en la facilitación duradera de la transmisión sináptica que tiene lugar tras la activación de una sinapsis por una estimulación intensa

de alta frecuencia de las neuronas presinápticas (Bliss y Collingridge, 1993; Lynch, 2004). En muchas estructuras nerviosas se produce PLP, aunque donde mejor se ha estudiado ha sido en tres sinapsis del hipocampo (Bliss y Collingridge, 1993; Kandel, 2001b):

- En las sinapsis de los axones de la vía perforante de la corteza entorrinal con las células granulares del giro dentado del hipocampo.
- En las sinapsis de los axones de las células dentadas granulares con las células piramidales del subcampo CA3.
- En las sinapsis de los axones del subcampo CA3 con las células piramidales del subcampo CA1.

Para estudiar la PLP en las células del giro dentado del hipocampo se aplicó en primer lugar un impulso eléctrico de baja intensidad a la vía perforante, y se registró la respuesta de múltiples neuronas a través de electrodos extracelulares colocados en la capa de células granulares del giro dentado del hipocampo. Con todo ello se pretendía determinar la línea base de la respuesta inicial. En segundo lugar, se aplicó una estimulación intensa de alta frecuencia durante 10 segundos a la vía perforante para producir la PLP. En tercer lugar, se midieron las respuestas de las células granulares ante impulsos únicos de corriente de baja intensidad tras varios periodos de demora para determinar su magnitud.

D.O. Hebb sostuvo que el mecanismo fundamental del aprendizaje es la facilitación de la transmisión sináptica. La PLP tiene dos propiedades que según Hebb, eran características de los mecanismos fisiológicos del aprendizaje y la memoria. En primer lugar, la PLP puede durar mucho tiempo. En segundo lugar, se produce solamente si el disparo de la neurona presináptica va seguido por el disparo de una neurona postsináptica. En la actualidad se reconoce que la co-ocurrencia del disparo de las células presináptica y postsináptica es el factor crítico en varias formas de plasticidad nerviosa. A todo este supuesto se le conoce como *postulado de Hebb para el aprendizaje* (Kandel, 2001a).

Este postulado ha ido encontrando cierto respaldo en investigaciones sucesivas, ya que se sabe que puede provocarse PLP con niveles bajos de estimulación que imitan la actividad nerviosa normal. Además los efectos de la PLP son más importantes en las estructuras que intervienen en el aprendizaje y la memoria (el hipocampo). También se sabe que el condicionamiento de la conducta puede producir en el hipocampo cambios similares a la PLP (Van der Zee y Luiten, 1999). Se ha descubierto que muchos fármacos que influyen en el aprendizaje y la memoria tienen efectos paralelos sobre la PLP. Donde más extensamente se ha estudiado la PLP es en las sinapsis donde predominan los receptores N-metil- D-aspartato (NMDA). El receptor NMDA, un subtipo de receptor ionotrópico para glutamato, no responde de forma masiva a menos que se produzcan simultáneamente dos acontecimientos: el glutamato y la glicina se unan a sus sitios de unión, y que la neurona postsináptica esté ya parcialmente despolarizada. Este requisito doble procede de que los canales de Ca^{2+}

vinculados a los receptores NMDA solamente permiten que entre en la neurona un pequeño número de iones de Ca^{2+} , a no ser que la neurona esté ya despolarizada cuando el glutamato se una al receptor; la entrada de iones Ca^{+2} es lo que dispara los potenciales de acción y pone en marcha la cascada de acontecimientos que se producen en la neurona postsináptica y dan lugar a la PLP (Israel y cols., 1993; Kandel, 2001b).

Se propusieron estudios fisiológicos para probar la hipótesis de que el RM M_1 es el subtipo molecular que media el aumento muscarínico de las corrientes NMDA en las neuronas piramidales en la región CA1 en rebanadas de hipocampo. Rouse y cols. (1999) encontraron que el carbacol produce una potenciación substancial de la corriente NMDA y que esta potenciación era bloqueada por atropina y la toxina-m1 altamente específica, indicando que los efectos están mediados por RM. El efecto fue irreversible, indicando que éste no fue debido a interacciones con otro subtipo de receptor. El bloqueo de la potenciación por la toxina-m1 no fue debida a efecto tóxico no específico ya que el agonista del receptor metabotrópico a glutamato 1S,3R-ACPD fue capaz de potenciar la corriente NMDA. Así, el RM M_1 media la habilidad de la ACh para aumentar la corriente NMDA. Para apoyar estos resultados, recientemente se ha demostrado que el aumento en la PLP es inducido por activación fisiológica de RM. Shinoe y cols. (2005) encontraron que tanto la aplicación de agonistas muscarínicos como la liberación endógena de ACh por estimulación repetida de fibras colinérgicas, aumenta la PLP en la región CA1 del hipocampo.

3. JUSTIFICACIÓN

El déficit colinérgico presente en la EA es el resultado de la pérdida masiva de neuronas, especialmente en neocortex, amígdala e hipocampo (Benzi y Moteretti, 1998). La importancia de las alteraciones del sistema colinérgico presentes en la EA fue confirmada al demostrar que la neurotransmisión colinérgica modula los procesos de memoria, aprendizaje y atención. Esto fue probado gracias a los siguientes hallazgos:

- Existe una correlación entre el déficit de CAT, las placas seniles y el deterioro cognitivo en los pacientes con EA (Mountjoy, 1986).
- Se produce un déficit cognitivo al usar fármacos anticolinérgicos centrales (por ejemplo, escopolamina [ESC]) tanto en personas sanas como en animales de experimentación, lo que podría equipararse a la deficiencia cognitiva presente en pacientes con EA (Benzi y Moretti, 1998).
- Se ha demostrado un empeoramiento en los procesos de aprendizaje y memoria en animales de experimentación asociado a la degeneración del prosencéfalo basal inducido por lesiones electrolíticas o con excitotoxinas, colinotoxinas o inmunotoxinas (Muir, 1996).

Estos hallazgos permitieron formular la *hipótesis colinérgica* de la enfermedad que es la que ha generado el actual abordaje terapéutico (Terry y Buccafusco, 2003).

El trabajo realizado con los derivados del *p*-aminofenol se basó en esta la hipótesis colinérgica de la EA. Considerando que tanto el aminofenol como sus derivados presentan en su estructura regiones molecularmente similares a las regiones de acoplamiento del sustrato natural (ACh), se considera que ello les permitirá acoplarse con el sitio ortostérico en los receptores colinérgicos (**Fig. 6**).

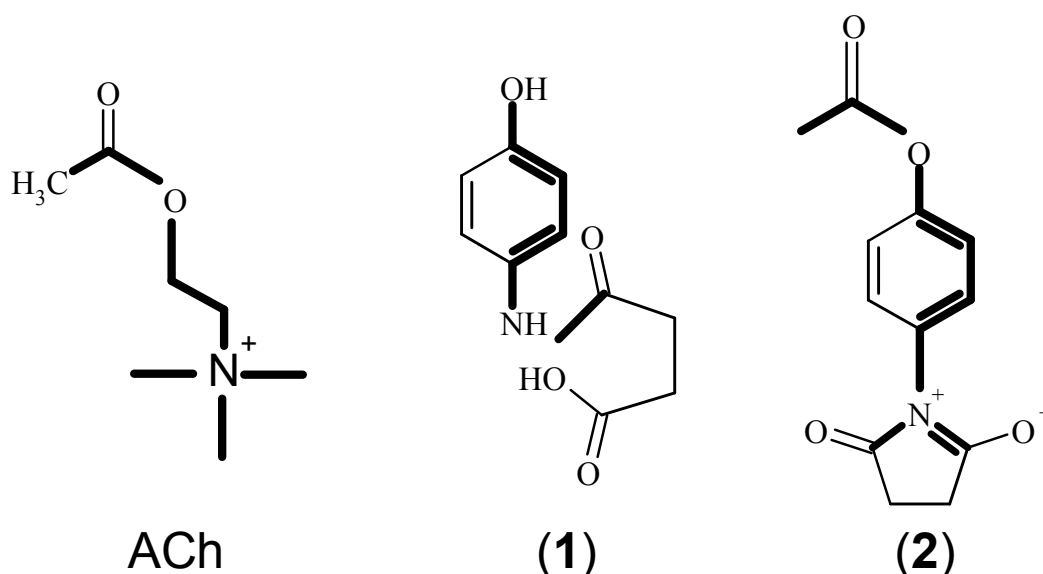


Figura 6. Estructura química de los derivados del *p*-aminofenol sintetizados en este estudio. (1) Succinamida de *p*-aminofenol. (2) Succinimida acetilada de *p*-aminofenol.

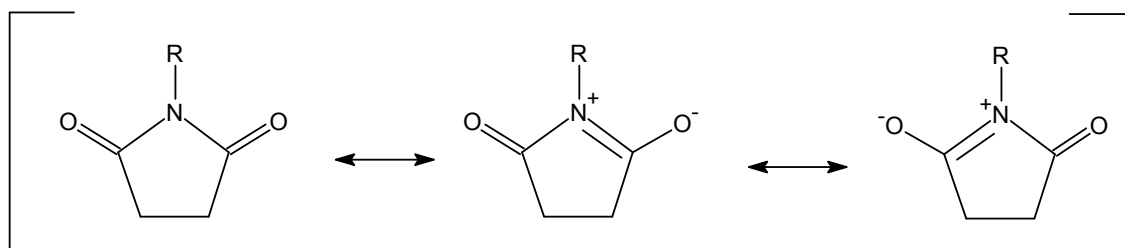
Para el diseño de la amida y de la imida, se consideraron diferentes factores que son importantes para obtener una actividad óptima:

1. Similitud estructural entre ACh y los compuestos propuestos, de cuya estructura es de interés la distancia existente entre el oxígeno carbonílico y

el nitrógeno imídico de la imida en comparación con el oxígeno esterático y el nitrógeno cuaternario de la ACh. Por lo que sé consideró necesario establecer la capacidad de unión de los diferentes compuestos, tomando en cuenta que para el acoplamiento de acetilcolina con el sitio de unión en los receptores colinérgicos, la distancia nitrógeno cuaternario-oxígeno esterático, es factor determinante.

2. Los compuestos fueron preparados a partir de moléculas aromáticas para aumentar la selectividad del reconocimiento molecular en la superficie externa del receptor, ya que sé sabe que cerca del 40% de sus componentes esta formado por anillos de aminoácidos aromáticos ricos en electrones. (Hulme y cols., 2003)

3. Aunque sé ha demostrado en varios estudios que las moléculas con un grupo amino con carga positiva son más selectivas en la unión con el receptor que los análogos sin carga, sé proponen moléculas sin carga fija para aumentar la liposolubilidad para que de este modo puedan atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al SNC, pero que sus híbridos de resonancia generen poblaciones de moléculas con carga positiva:



3. La ACh puede existir en cuando menos dos conformeros energéticamente favorecidos. De las dos, la conformación *gauche* es la más favorecida energéticamente, debido a las interacciones atractivas entre el nitrógeno cuaternario y el oxígeno esterático. Por lo que se justifica un análisis de rayos X que sugiera cual de los compuestos se asemeja más a la ACh, y a que conformación de ésta ya que los compuestos propuestos son de rotación restringida.

A partir de estudios previos realizados en el Laboratorio de Bioquímica Médica 1, se ha puesto de manifiesto la capacidad de unión de los derivados de *p*-aminofenol a RM por cálculos teóricos (Espinosa-Raya y cols., en prensa). Por lo anterior y tomando en consideración la similitud estructural de los derivados de aminofenol con la ACh, se considera necesario realizar la evaluación de la unión de la succinamida y succinimida acetilada de *p*-aminofenol sobre RM y valorar su capacidad de revertir la amnesia inducida por ESC en dos modelos de memoria y aprendizaje.

4. HIPÓTESIS

Tomando en cuenta que los derivados de *p*-aminofenol guardan similitud estructural con la ACh y que teóricamente se unen al receptor muscarínico M₁, se espera que la succinamida y la succinimida de *p*-aminofenol compitan por el sitio de unión de la ACh en los RM y por lo tanto antagonicen la unión de la [³H]N-metilescopolamina en las pruebas de unión de radioligando y reviertan la amnesia inducida por ESC en dos modelos de memoria y aprendizaje.

5. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar en ausencia de solvente la succinamida y la succinimida acetilada de *p*-aminofenol y evaluar la actividad colinérgica central de ambas.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Sintetizar en ausencia de solvente y caracterizar químicamente la succinamida y succinimida acetilada de *p*-aminofenol.
2. Evaluar la afinidad de los dos derivados del *p*-aminofenol por los receptores muscarínicos M₁.
3. Evaluar el efecto de la succinamida y la succinimida acetilada de *p*-aminofenol sobre la amnesia inducida por ESC.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratas Wistar macho con peso 250 ± 20 g. Todos los animales fueron suministrados por el Bioterio de la Institución y se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura y humedad, con ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas (10:00 am – 10:00 pm) y con agua y comida a libre demanda.

7.2. REACTIVOS Y FÁRMACOS

Todos los reactivos utilizados para la síntesis de los compuestos fueron de grado analítico. El anhídrido succínico y el *p*-aminofenol, ESC y galantamina (GAL) fueron comprados a la casa Sigma-Aldrich. La [³H]N-metil-escopolamina ([³H]NMS), la polietilenimina y el líquido de centelleo fueron donados por el CINVESTAV. La ESC y la GAL se disolvieron en solución salina fisiológica, mientras que los derivados de *p*-aminofenol en aceite vegetal. Todos los fármacos fueron administrados intraperitonealmente (1 mL/kg).

7.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS

7.3.1. SÍNTESIS DE LA SUCCINAMIDA DE *p*-AMINOFENOL

Las amidas se sintetizaron siguiendo el protocolo de la Química Verde (Angelo, 2004) haciendo reaccionar mol a mol el *p*-aminofenol con anhídrido succínico en ausencia de solvente, con agitación continua por

dos horas a temperatura ambiente (Trujillo-Ferrara y cols., 2005). El compuesto resultante se lavó dos veces con agua acidulada pH 4 y se determinó la pureza del compuesto por cromatografía en capa fina (Sílica gel 60F₂₅₄, 0.25mm) (**Fig.7**)

7.3.2. SÍNTESIS DE LA SUCCINIMIDA ACETILADA DE *p*-AMINOFENOL

Se obtuvo por deshidratación de la amida usando acetato de sodio como catalizador; la reacción se llevó a cabo en ausencia de solvente a 85 °C con agitación continua por 5 h (Angelo, 2004; Trujillo-Ferrara y cols., 2005). El compuesto se lavó con agua acidulada pH de 4 y se determinó la pureza del compuesto por cromatografía en capa fina (Sílica gel 60F₂₅₄, 0.25 mm). (**Fig.7**)

7.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS DE *p*-AMINOFENOL

La estructura de los compuestos se verificó por RMN ¹H y ¹³C en un espectrómetro Jeol GSX-270 para ¹H y 68.7 MHz para ¹³C utilizando DMSO-*d*₆ como solvente y tetrametilsilano como referencia interna. La asignación total de los espectros se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros de correlación bidimensional ¹H y ¹³C. El espectro de infrarrojo (IR) fue determinado en un espectrofotómetro Perkin Elmer 16F-FT-IR en pastilla de KBr. Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5989^a Serie II. Los datos de masas se describen en unidades de m/z, los valores entre paréntesis indican la abundancia relativa al 100% del pico base. El punto de fusión de

cada compuesto se determinó en tubos capilares con un aparato digital Electrothermal 9300 y no están corregidos.

Se hicieron soluciones saturadas de la succinamida y la succinimida acetiladas de *p*-aminofenol, utilizando etanol absoluto como disolvente, se dejaron en reposo aproximadamente 24 horas hasta obtener cristales con las características necesarias. Se analizaron los cristales de cada compuesto mediante difracción de Rayos X en un difractómetro Enraf-Nonious CAD4, en el Departamento de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

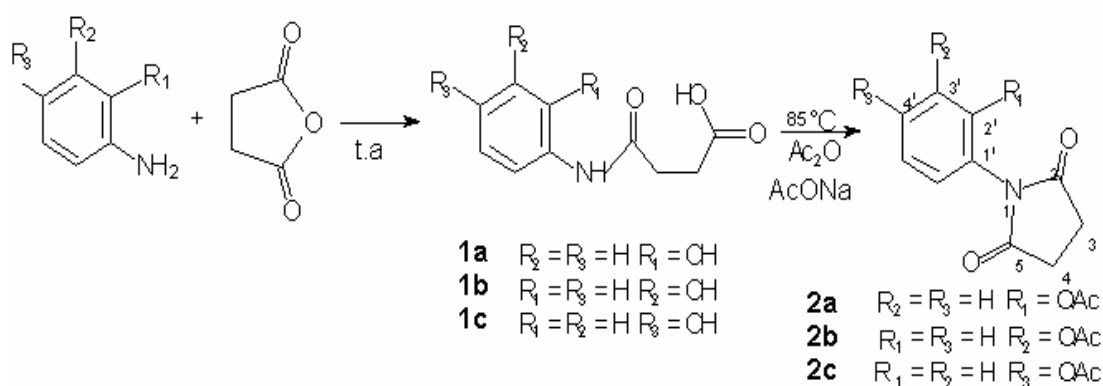


Figura 7. Ruta de síntesis de derivados de o, m y p-aminofenol.

7.4. ESTUDIOS DE AFINIDAD DE LOS COMPUESTOS POR UNIÓN DE RADIOLIGANDO A LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS

7.4.1. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS

Se sacrificaron por decapitación ratas Wistar macho (2 por experimento) para extraer los hipocampos. Los hipocampos fueron homogeneizados en solución Tris-HCl (10mM, pH 7.4 a 25°C) conteniendo 1mM de EGTA utilizando un homogenizador de vidrio (Glas-Col, 099C-K44). El homogeneizado fue centrifugado a 20000 x g durante 20 min a 4 °C y la pastilla fue resuspendida en solución Tris-HCl 50 mM sin EGTA para ser centrifugada nuevamente en las mismas condiciones. La pastilla resultante se resuspendió para los ensayos de saturación.

7.4.2. ENSAYOS DE SATURACIÓN

Los análisis de saturación se realizaron en 500 µL de mezcla de incubación: 100 µL de la suspensión (30-50 µg de proteína), 250 µL de radioligando en concentraciones crecientes ($[^3\text{H}]\text{NMS}$), 10 µL del fármaco selectivo no marcado (atropina 1 µM) para determinar la unión inespecífica, y 150 de la solución de incubación Tris-HCl 50 mM + MgCl_2 5 mM. Se realizaron seis determinaciones para cada concentración, 3 para la unión total y 3 para la unión inespecífica. La incubación se mantuvo a 30 °C con agitación lenta durante 60 min y fue detenida por filtración rápida a través de papel de fibra de vidrio (Whatman GF/B) previamente neutralizado con polietilenimina (3%) durante al menos 2 h. Los filtros fueron lavados 3

veces con solución fría antes de ser transferidos a viales con 7 mL de líquido de centelleo. Las lecturas de las muestras en ausencia y en presencia del fármaco no marcado correspondieron a la unión total y a la unión inespecífica, respectivamente. La unión específica se obtuvo al sustraer la unión inespecífica de la unión total.

7.4.3. ENSAYOS DE COMPETENCIA

En estos estudios se valoró la capacidad de los compuestos sintetizados para desplazar la fijación específica del radioligando.

Las membranas del hipocampo fueron resuspendidas en la solución de incubación ya indicada. Los experimentos se realizaron en 500 μL de mezcla de incubación: 100 μL de suspensión de membranas, 250 μL de radioligando a una concentración constante, 10 μL de concentraciones crecientes del fármaco a estudiar, y 140 μL de la solución de incubación. Cada punto de la curva se realizó por triplicado, además de un grupo para medir la unión total y uno más para la unión inespecífica. La mezcla de incubación se mantuvo a 30 °C con agitación lenta hasta alcanzar el equilibrio (60 min). La reacción fue detenida por filtración rápida y los filtros fueron lavados tres veces con solución Krebs-Henseleit fría (en mM: NaCl 124.5, KCl 3, MgSO_4 1, KH_2PO_4 1.2, CaCl_2 1.8, NaHCO_3 16.5 y glucosa 11, pH 7.4) antes de ser transferidos a viales con 7 mL de líquido de centelleo a fin de determinar la radioactividad presente. Finalmente, los resultados se expresaron como porcentaje de la unión específica del grupo control.

7.4.4. PRUEBA DE PROPORCIÓN DE AFINIDADES

En estos experimentos se valoró la capacidad de la succinamida para modificar la afinidad del carbacol a las membranas del hipocampo.

Las membranas del hipocampo fueron resuspendidas en la solución de incubación en ausencia y en presencia de 10 μL de una concentración fija de la succinamida de *p*-aminofenol (1 μM) y 10 μL de concentraciones crecientes de carbacol. Las cantidades de tejido, el medio y las condiciones de incubación fueron idénticas a las usadas en los experimentos anteriores.

7.5. MODELOS DE AMNESIA INDUCIDA POR ESCOPOLAMINA

7.5.1. MODELO DE APRENDIZAJE DE TIPO AUTO-MOLDEAMIENTO

Animales. Los animales de experimentación se mantuvieron bajo condiciones de luz controlada 12:12h (10:00 am - 10:00 pm) en ciclo invertido una semana antes de iniciar el entrenamiento. El día previo al ensayo se limitó la comida hasta que el periodo de aprendizaje concluyó.

El entrenamiento se realizó en una caja de Skinner de Med Associates Inc. (WMPC 1999). Los animales se dividieron en grupos de 8, de la siguiente manera: un grupo-control; grupo ESC; grupo GAL; grupo GAL-ESC, grupo amida 10 mg/kg, grupo imida 10 mg/kg. Se usaron otros grupos

independientes para administrar 4 dosis diferentes de los derivados (1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/kg) combinadas con la administración de ESC.

Una rata hambrienta se colocó en la cámara condicionante (caja de Skinner) y se colocaron 20 trozos de comida en el comedero para que ésta pudiera “reconocer” donde podría encontrar alimento. Durante el periodo de habituación, a cada rata se le permitió explorar la caja operante hasta encontrar y consumir la comida y después se inició el programa de auto-moldeamiento.

El auto-moldeamiento básicamente consiste en que el animal se “auto-enseña” a presionar una palanca y para que ocurra esto se usó el siguiente procedimiento de ensayos discretos.

Un ensayo se definió como la presentación de una palanca y el encendido de un foco, que iluminó la palanca, por 1 min (EC); al término de este período la luz se apagó y se entregó un trozo de comida (EI). Inmediatamente después se dio inicio a otro ensayo. Debido a tendencias de las respuestas innatas y a la actividad aleatoria, la rata presionó la palanca. Si la rata recibía puntualmente comida cuando presionaba la palanca, su tasa subsiguiente de presión de la palanca durante el EC aumentó por encima de la tasa espontánea (RC). Después de un número de secuencias, el animal experimentó el EC y presentó la RC, tal como tocar o presionar la palanca. El incremento o decremento de RC se consideró como una mejoría o deterioro del aprendizaje, respectivamente.

Cada animal se colocó en la cámara experimental por un período de habituación de 20 min. Se dieron 3 sesiones de autoaprendizaje: 20 ensayos las dos primeras y 10 ensayos en la última sesión, con 24 h de diferencia entre cada una. Se registraron los resultados obtenidos en el tercer día de sesión, se promediaron y se expresaron en unidades de porcentaje (Meneses, 2003).

7.5.2. LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE T

Animales. Los animales de experimentación se mantuvieron bajo condiciones de luz controlada 12:12 h (10:00 am – 10:00 pm) en ciclo invertido una semana antes de iniciar el entrenamiento con agua y comida a libre demanda. Se formaron 8 grupos de la siguiente manera: un grupo control; grupo ESC; grupo GAL - ESC, y otros grupos independientes para administrar diferentes dosis de los derivados (1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/kg de la amida y 10 mg/kg de la imida) combinadas con la administración de ESC.

Se utilizó un laberinto en forma de T elevado 50 cm del piso, con dos brazos opuestos abiertos (50x10 cm) y un brazo cerrado sin techo (50x10x40 cm) todos extendiéndose de una plataforma central (10x10 cm). Los brazos abiertos tienen una orilla de plástico para evitar la caída de las ratas. Cada sesión se grabó con una videocámara. Después de cada ensayo el aparato se limpió con solución de etanol al 10%.

Sesión de entrenamiento. Cada rata se colocó inicialmente al final del brazo cerrado del LET. Al animal se le permitió explorar el brazo cerrado por un máximo de 300 s (criterio de evitación). Si la rata dejó el brazo cerrado colocando sus cuatro extremidades en uno de los brazos abiertos, el ensayo se terminó y el animal se regresó a su caja por 30 s. Después de este tiempo, la rata se volvió a someter a tantos ensayos como fueron necesarios para alcanzar el criterio de evitación, en otras palabras debió permanecer en el brazo cerrado durante 300 s.

Además, cuando la rata exploró alguno de los brazos abiertos (BA) colocando 1, 2 ó 3 de sus extremidades fuera del brazo cerrado y regresó a su posición original, esto se registró como un intento, mismo que sirvió para calcular el índice de riesgo (IR) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{IR} = \frac{\text{Frecuencia de intentos}}{\text{Entradas en el BA} + \text{Frecuencia de intentos}}$$

Este parámetro nos permitió eliminar la posibilidad de que el animal permaneciera en el brazo cerrado por habituación, por una falta de motivación o por un efecto ansiolítico. Así, un valor de IR = 0 implica una incapacidad de asociación de la rata, mientras que un IR = 1 implica una respuesta máxima de aprendizaje en este modelo.

Sesión de prueba. Setenta y dos horas después de la sesión de entrenamiento las ratas fueron colocadas en el brazo cerrado y se registró

la latencia para entrar a alguno de los brazos abiertos solo una vez (De-Mello y Carobrez , 2002).

En ambos modelos los fármacos se administraron en la primera sesión, la ESC se administró al final de la sesión de entrenamiento y la GAL y los derivados de *p*-aminofenol 45 min antes de iniciarla.

7.6. PRUEBA DE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

Esta prueba se realiza con el fin de descartar cualquier alteración motora que pudiera afectar el desempeño de los animales en las pruebas de memoria y aprendizaje. Se detecta tanto la movilidad total que tenga el animal durante el tiempo de experimentación así como la actividad ambulatoria. Esto con el fin de tener una evaluación lo más completa posible de la actividad espontánea del animal. Se coloca a la rata durante 5 minutos dentro de una caja de acrílico de 10x20x40cm la cual contiene sensores que permiten contabilizar automáticamente la actividad general del animal (OPTOVARIMEX). La evaluación se realizó después de la prueba de memoria y aprendizaje.

7.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia entre los diferentes tratamientos y dosis se analizó con ANOVA de una vía ($\alpha=0.05$). La comparación entre medias se realizó, *post hoc*, usando el método de Tukey.

8. RESULTADOS DE LA SÍNTESIS

La síntesis de los compuestos propuestos se realizó con resultados satisfactorios, ya que los rendimientos de los compuestos son buenos, además de ser un procedimiento relativamente sencillo, rápido y ecológico (Tabla 1). Se comprobó la pureza de cada compuesto utilizando la técnica de cromatografía en capa fina de sílica gel. La determinación de la estructura se apoyó por espectroscopía de RMN de ^1H (300 MHz) y ^{13}C (68.7MHz) (Figs. 8 y 9), IRR y espectrometría de masas(Fig. 10); y del compuesto que se obtuvieron cristales, por difracción de rayos X (Fig. 11).

COMPUESTO	RENDIMIENTO %	PUNTO DE FUSION °C	DISTANCIA O-N Å
Succinamida	80	224 226	
Succinimida	63	145 147	5.7755
<i>trans</i> -acetilcolina			5.2
<i>gauche</i> -acetilcolina			2.73

Tabla 1. Resultados de la síntesis de los compuestos.

Los resultados obtenidos de espectroscopía de RMN sugieren que el proceso de síntesis propuesto produjo los compuestos diseñados. Se seleccionó la succinimida acetilada de *p*-aminofenol para ejemplificar los espectros de RMN (Figs. 8 y 9).

Para los espectros de RMN de ^1H , la asignación de las señales correspondientes a los hidrógenos que se encuentran en la región aromática del compuesto se llevó a cabo basándose en los efectos inducidos por los sustituyentes sobre la señal del benceno utilizando la siguiente fórmula:

$$\delta_{\text{H}} = 7.27 - \sum \text{efectos}$$

Al asignar contundentemente los hidrógenos se asignaron las señales correspondientes a los carbonos en el espectro respectivo de RMN de ^{13}C , adicionalmente nos apoyamos en el cálculo de los efectos inducidos por los sustituyentes sobre el desplazamiento de la señal de los carbonos del benceno, utilizando la fórmula siguiente:

$$\delta_{\text{C}} = 128.5 - \sum \text{efectos}$$

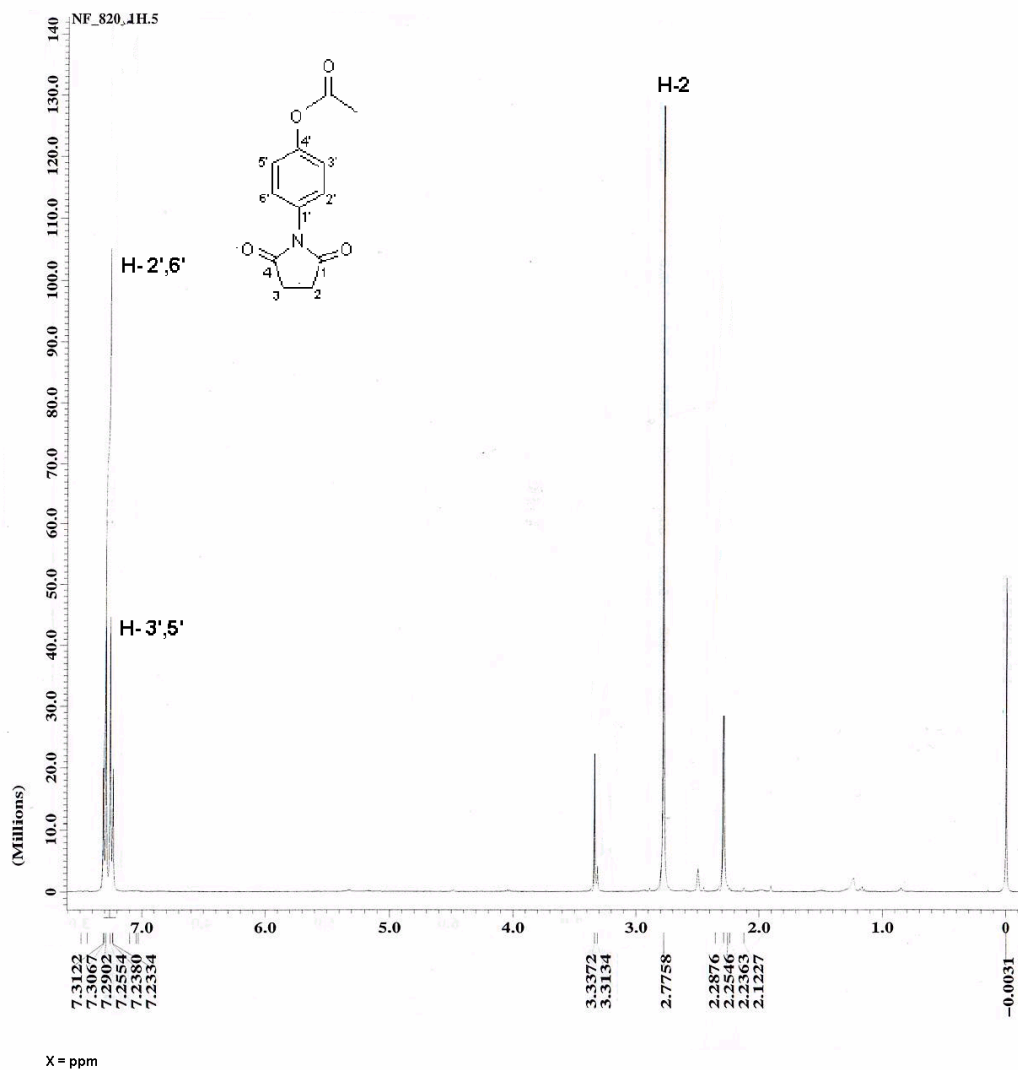


Figura 8. Espectro de RMN ^1H para succinimida acetilada de p-aminofenol. RMN ^1H (270MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 2.78 (4H, s, H-2), 7.26 (2H, d, J=8.6, H-3',5'), 7.31 (2H,d,J=8.6, H-2',6').

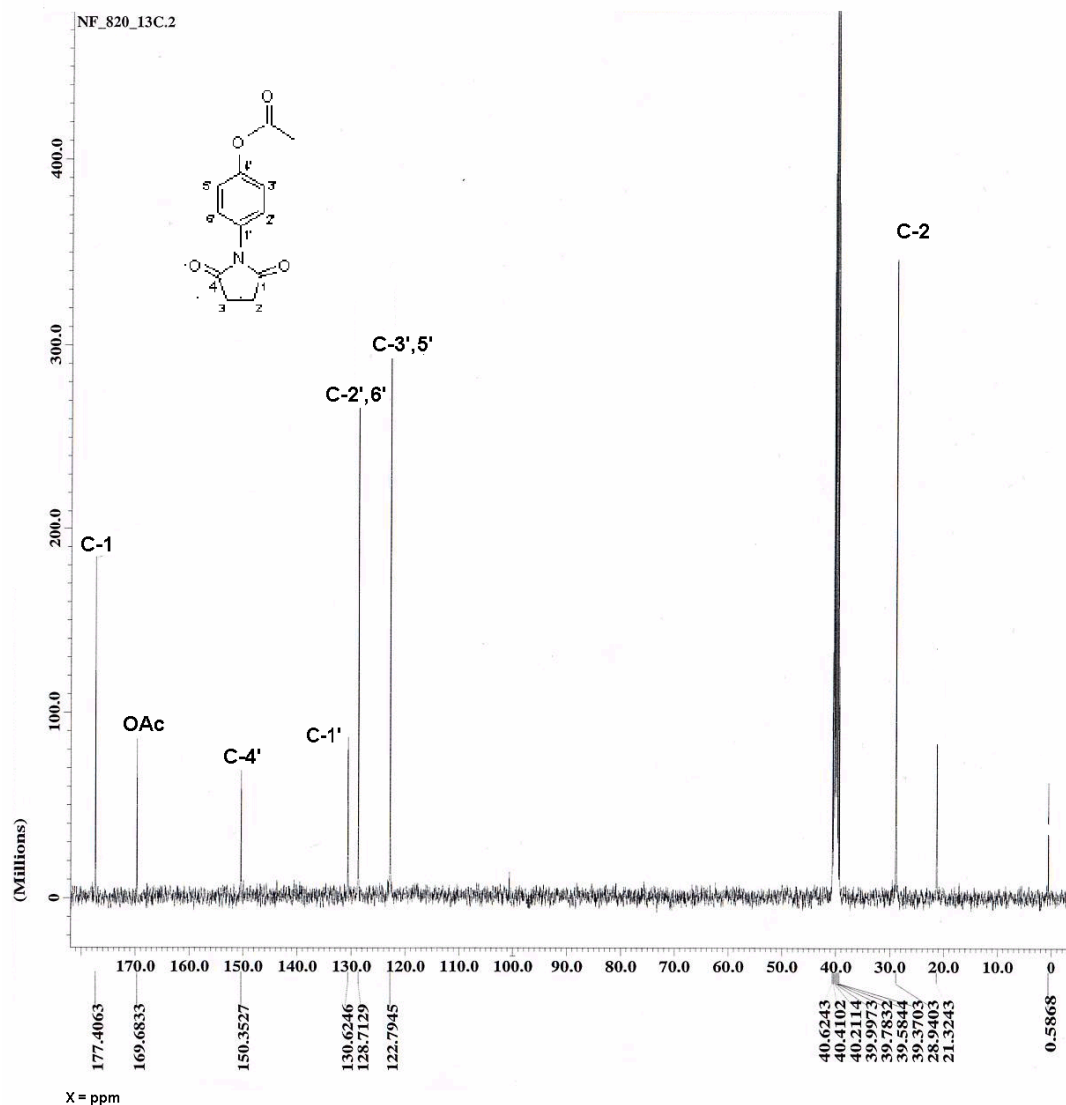


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C para succinimida acetilada de p-aminofenol. RMN ^{13}C (68.7 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm), 177.4 (C-1), 28.9 (C-2), 177.4 (C-4), 130.6 (C-1'), 128.7 (C-2',6'), 122.8 (C-3',5'), 150.4 (C-4'), OAc 169.7.

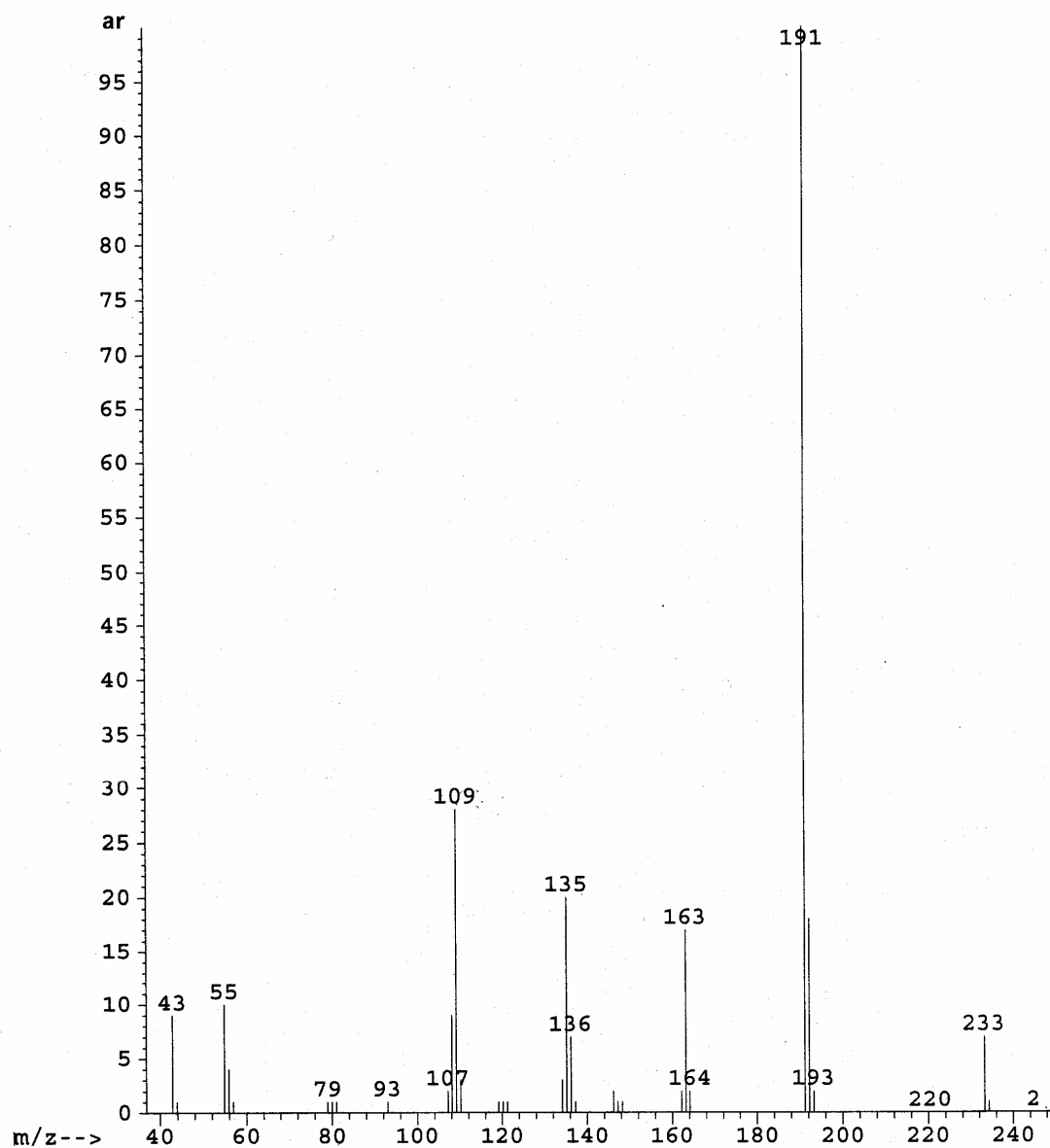


Figura 10. Espectro de masas para succinimida acetilada de *p*-aminofenol obtenido por impacto electrónico. (emie) m/z (% ar): 233 (7) M^+ , 191 (100), $[M - CH_2CO]^+$, 163 (17) $[M - CH_2CO - CO]^+$, 135 (21) $[M - CH_2CO - 2CO]^+$, 109 (29) $[M - CH_2CO - 2CO - C_2H_4]^+$.

Respecto a la obtención de cristales, éstos se obtuvieron sólo de la succinimida y fueron usados para los estudios de cristalografía por rayos X, con lo que se obtuvieron datos de distancias y ángulos de enlace (Tabla 2). Los mejores cristales se obtienen con etanol y gotas de agua.

DATOS DEL CRISTAL	Succinimida
Fórmula	C ₁₂ H ₁₁ NO ₄
Tamaño del cristal (mm)	0.2 x 0.2 x 0.4
PM (g mol ⁻¹)	233.22
Grupo espacial	P 2 ₁
Parámetros de celda	
a (Å)	7.827 (2)
b (Å)	6.250 (2)
c (Å)	12.068 (4)
α (°)	90
β (°)	106.34 (3)
γ (°)	90
V (Å ³)	566.5 (3)
Z	2
μ (mm ⁻¹)	0.097
ρ _{calc} (g cm ⁻³)	1.37
Colección de datos	
No. reflex.colect.	1558
No. reflex. Ind	1490
No. reflex. obs.	971
Refinamiento	
R	0.031
R _w	0.024
W	1/σ ²
No. de variables	189
GOOF	1.99

Tabla 2. Datos cristalográficos para succinimida acetilada de p-aminofenol.

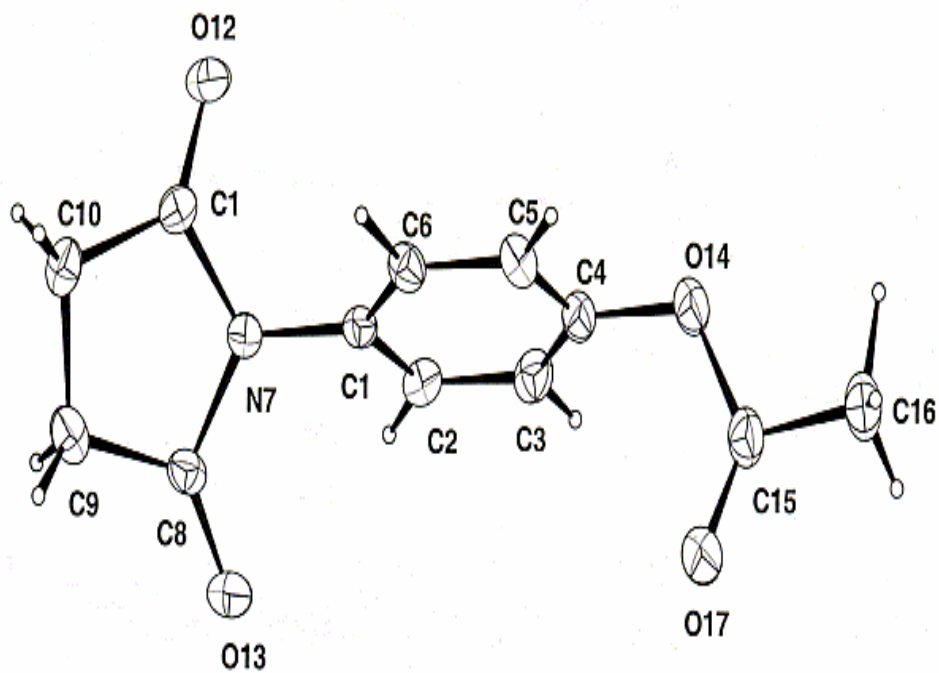


Figura 11. Perspectiva de la estructura molecular de succinimida acetilada de p-aminofenol.

8.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA SÍNTESIS

Los compuestos fueron sintetizados de acuerdo con los principios de la Química Verde que deriva del programa “Green Chemistry” de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los E.U. y está orientada a conseguir que los procesos químicos sean más respetuosos con el entorno, mediante el diseño químico de procesos y productos nuevos, evitando catalizadores y disolventes que provoquen un impacto negativo ambiental; ésta tiene como objetivo la producción de sustancias con la máxima productividad, calidad y seguridad para los seres humanos y el medio ambiente (Angelo, 2004).

Los reactivos utilizados en la síntesis fueron de grado analítico, no se utilizaron disolventes, es decir las reacciones fueron en seco. Los porcentajes de rendimiento en las reacciones de síntesis de los compuestos fueron superiores al 80%, lo que indica que la ruta de síntesis es la adecuada, además de ser un procedimiento relativamente económico y sencillo.

En el caso de las succinimidias, su formación se confirmó por la desaparición de las señales triples correspondientes a la región metilénica, para generar una sola señal lo cual se debe a que al cierre, los cuatro hidrógenos metilénicos se hacen equivalentes por simetría, con un desplazamiento químico alrededor de las 3.0 ppm. Los fragmentos aromáticos mostraron un sistema AA'BB' con una $J = 8.6$ típico de un benceno *p*-sustituido. La señal a campo bajo se asigna a los protones *orto*

al ester mientras que la señal a campo alto de la región aromática se asigna a los protones *meta* al ester. Los espectros de masas mostraron los iones moleculares en 209 y 233 m/z, los cuales corresponden al peso molecular de la succinamida y de la succinimida acetilada de *p*-aminofenol, respectivamente (**Fig. 10**). Tomando en cuenta los resultados espectroscópicos, se puede afirmar que el proceso de síntesis y purificación produjo los compuestos diseñados.

Con los datos estructurales obtenidos mediante los estudios cristalográficos de succinamidas y succinimidias puede inferirse que los compuestos sintetizados son rígidos, casi planos y el análisis de las estructuras de los compuestos sugiere que los compuestos en *para* se relacionan con la conformación *trans* de la ACh (Bikádi y Simonyi, 2003) (**Fig. 11**)

9. RESULTADOS FARMACOLÓGICOS

9.1. ENSAYOS DE SATURACIÓN

Mediante los experimentos de saturación se estudió la unión específica de [³H] NMS, antagonista de los RM. Esto permitió caracterizar la fijación del radioligando en preparaciones de membranas obtenidas del hipocampo de rata, información necesaria para poder realizar las curvas de competencia.

La fijación de la [³H] NMS a los RM fue un proceso saturable de alta afinidad (del orden nanomolar). Se obtuvo una $K_d = 0.47 \pm 0.03$ nM. En la **Fig. 12** se presenta una curva representativa de los experimentos de saturación.

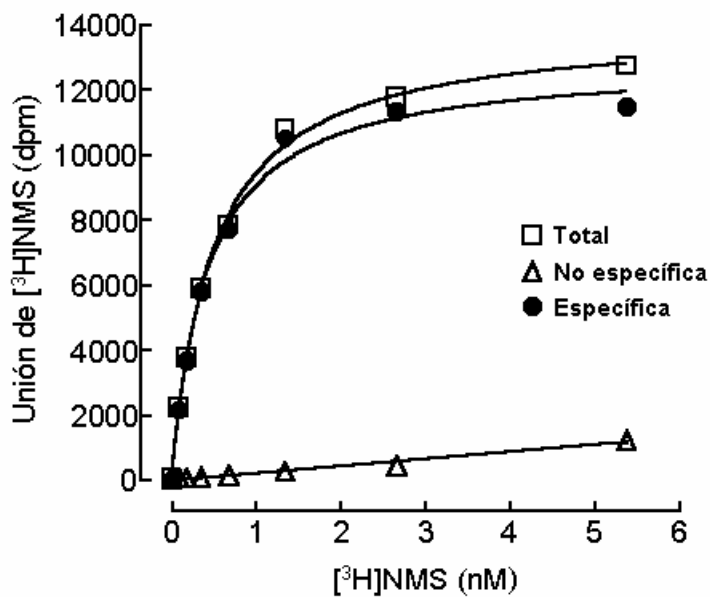


Figura 12. Unión de [³H] NMS a membranas de hipocampo de rata. Las membranas se incubaron con concentraciones crecientes del radioligando. Se muestra un solo experimento, donde los puntos representan el promedio de determinaciones por triplicado.

9.2. ENSAYOS DE COMPETENCIA

En los ensayos de competencia se valoró la capacidad de la succinamida y la succinimida para desplazar la fijación específica de la [³H] NMS. Se incubaron por triplicado las muestras con concentraciones crecientes de cada compuesto en presencia de una concentración fija de radioligando próxima a la *K_d*. Al analizar las curvas obtenidas se observó que los compuestos no inhibieron la unión específica del radioligando (Figs. 13y 14).

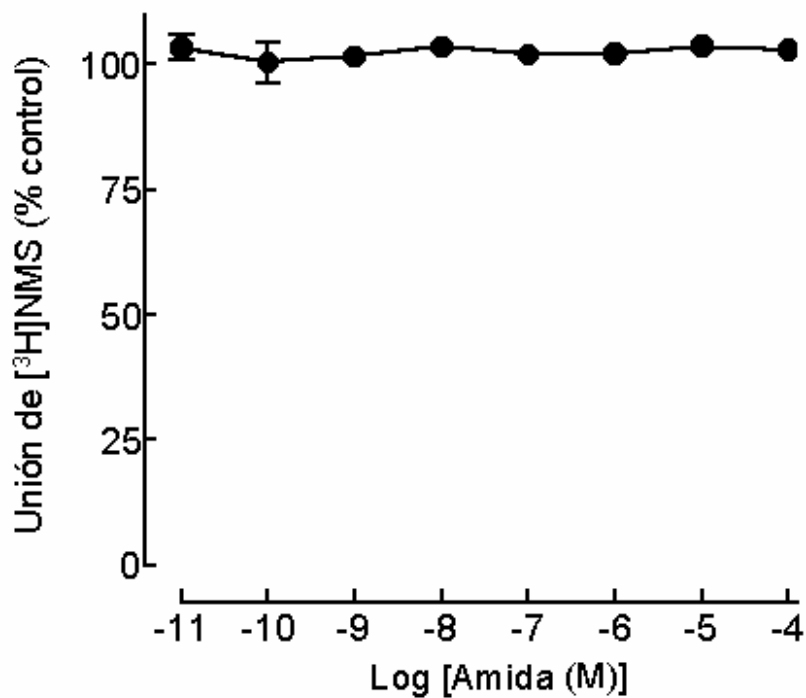


Figura 13. Inhibición de la unión de la [³H] NMS a membranas de hipocampo de rata por la succinamida de *p*-aminofenol. Los resultados se expresan como porcentaje de la unión del control. Se muestra un solo experimento de tres realizados, donde los puntos representan el promedio de determinaciones por triplicado.

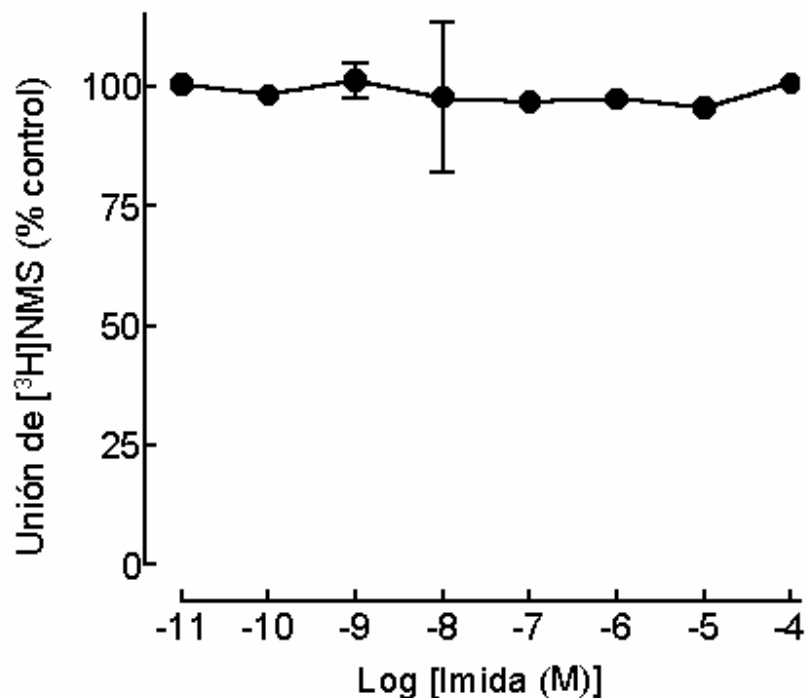


Figura 14. *Inhibición de la unión de la [³H]NMS a membranas de hipocampo de rata por la succinimida de p-aminofenol. Los resultados se expresan como porcentaje de la unión del control. Se muestra un experimento de tres realizados, en el cual los puntos representan el promedio de determinaciones por triplicado.*

9.3. PRUEBA DE PROPORCIÓN DE AFINIDADES

Tomando en cuenta que en un estudio previo en el que se valoró por cálculos teóricos la unión de los compuestos a los RM M1 se observó que la succinamida se unía a un sitio alostérico (Espinosa-Raya y cols., en

prensa), se valoró la capacidad de este compuesto para modular (aumentar o disminuir) la afinidad de un agonista muscarínico. En estos experimentos se incubaron por triplicado la suspensión de membranas con concentraciones crecientes de carbacol en presencia y en ausencia de una concentración fija de la succinamida ($1\mu\text{M}$). Al hacer el análisis de la curva obtenida se observó que la presencia de la amida no afecta la inhibición de la unión del radioligando mediada por el carbacol (**Fig. 15**).

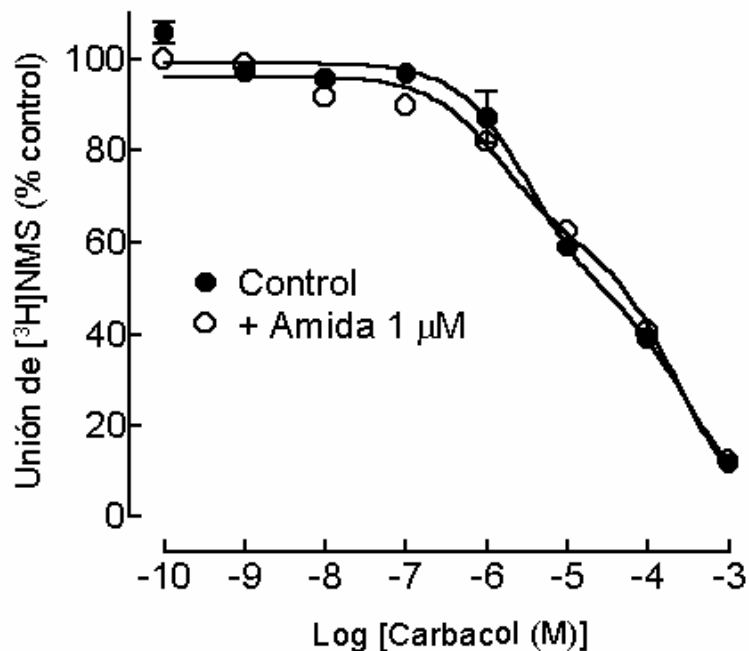


Figura 15. Unión de la $[^3\text{H}]$ NMS a membranas de hipocampo incubadas en presencia de concentraciones crecientes de carbacol y una concentración fija de la succinamida de *p*-aminofenol (○) o en ausencia de ésta (●). Los resultados se expresan como porcentaje de la unión del control. Se muestra un experimento de dos realizados, donde los puntos representan el promedio de determinaciones por triplicado.

9.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS FARMACOLÓGICOS

En un trabajo previo, donde se evaluó la unión de los derivados a los RM M_1 por cálculos teóricos (Espinosa-Raya y cols., en prensa), se encontró que los dos derivados de *p*-aminofenol se unen al sitio de unión de la ACh (amida: ΔG_b -6.95 kcal/mol; imida: ΔG_b -7.5 kcal/mol), pero con menos afinidad que la ESC (ΔG_b -10.48 kcal/mol). En los resultados de las pruebas de inhibición de la fijación específica de la [3 H] NMS se pudo observar que los compuestos no inhiben la fijación del radioligando, dato que concuerda con lo encontrado en las simulaciones de acoplamiento.

Como dato adicional, en las simulaciones de acoplamiento se observó que la amida se unía a un sitio alostérico cercano al asa intracelular 3 y al dominio transmembrana 6 entre los residuos N93, T225, E226, K233, A234, N60, N61, K230, V229, S227, T58, N293, A295 (ΔG_b -7.81 kcal/mol; basándose el modelo de Homología de Hulme para el receptor M_1). Este hallazgo permitió suponer que la amida se comportaría como un modulador alostérico por lo que se optó por buscar y realizar un ensayo que permitiría evaluar el posible efecto de modulación alostérica.

El término alostérico (“otro sitio”), fue introducido en una serie de trabajos en enzimología por Monod y cols. (1963, 1965), ellos identificaron varias características que están asociadas con proteínas alostéricas clásicas, éstas incluyen: una estructura oligomérica; sitios múltiples de unión para el ligando; equilibrio conformacional múltiple en ausencia del ligando; y la estabilización de conformaciones específicas de la proteína por ligandos.

Posteriormente, se reconoció que estas características estaban asociadas a canales iónicos operados por ligando y se postularon los primeros modelos para receptores alostéricos. Una propiedad importante de estos modelos es la predicción de la actividad del receptor en la ausencia de ligando como una consecuencia del proceso de isomerización, que es una actividad constitutiva del receptor. Estos modelos son conocidos como “modelos de dos estados” o “de múltiples estados” (Christopoulos, 2002; Karlin, 1967).

En contraste, el estudio del comportamiento de receptores acoplados a proteínas G (RAPG) permaneció por mucho tiempo como “operacional” hasta las dos últimas décadas del siglo veinte. Con la propuesta de que los receptores podrían traslocar dentro de la membrana celular y asociarse con otras proteínas de unión se llegó al desarrollo importante de una segunda teoría de receptores alostéricos, el “modelo del complejo terciario” (MCT) de De Lean y cols. (1980). Las primeras publicaciones del MCT fueron sobre la interacción alostérica entre la unión del agonista y el acoplamiento de la proteína G, pero el modelo fue igualmente aplicable al mecanismo que involucra la unión simultánea de dos ligandos a un receptor, un fenómeno que fue primariamente visto en la familia de RM (Clark y Mitchelson, 1976; Stockton y cols., 1983), pero subsecuentemente demostrado para otros RAPG.

En la **Fig.16** se muestra el MCT, el mecanismo más simple que describe una interacción alostérica entre dos ligandos, A y B, cada uno con afinidad a sitios de unión topográficamente distintos en el mismo receptor. En este

modelo, el ligando A se une al sitio ortostérico con una afinidad K_a , mientras el ligando B se une a un sitio alostérico con una afinidad K_b . El símbolo α es frecuentemente llamado “factor de cooperatividad”, y cuantifica la magnitud con la cual la afinidad de un ligando es cambiada por otro ligando cuando ambos se unen al receptor para formar un complejo terciario, ARB. La habilidad de un modulador alostérico para causar un cambio en la afinidad del ligando ortostérico se relaciona con la perturbación que el modulador induce en la conformación del receptor. Como el equilibrio de unión de un complejo ligando-receptor depende de la proporción de las velocidades de asociación y disociación, entonces el mecanismo más simple que subyace en las interacciones alostéricas en el MCT es una alteración en la asociación/disociación del ligando ortostérico. Este aspecto de la interacción alostérica forma la base de ensayos específicos que están diseñados para detectar o validar a moduladores alostéricos (Christopoulos, 2002).

Otra propiedad importante de las interacciones alostéricas es que ellas son naturalmente recíprocas. Además, en contraste a las interacciones ortostéricas, las interacciones alostéricas de este tipo se caracterizan por dos constantes de afinidad, que junto con el factor de cooperatividad, definen el grado de interacción alostérica. En el MCT, valores de $\alpha > 1$ resultan en afinidad aumentada (cooperatividad positiva), mientras valores de $\alpha < 1$ denotan una afinidad disminuida (cooperatividad negativa). Interesantemente, es también posible que la afinidad del otro ligando permanezca inalterada en el receptor ocupado; α entonces es igual a 1, y la interacción se caracteriza por una cooperatividad neutral. Otra propiedad

del MCT es que la magnitud y dirección del efecto alostérico entre dos sitios depende de la naturaleza química de A y B; diferentes pares de ligandos que interactúen en los mismos sitios ortostéricos y alostéricos del receptor pueden tener tipos marcadamente diferentes de cooperatividad. Esta es una consideración importante en los programas de desarrollo de fármacos que tienen sitios alostéricos como blanco (Christopoulos, 2002).

Hasta hace pocos años, el ensayo principal para el cernimiento en el proceso de desarrollo de fármacos había sido la unión de radioligandos. Sin embargo, los hallazgos que hacen útil los ensayos de unión para detectar ligandos ortostéricos no necesariamente aplican para la detección de ligandos alostéricos; aunque un ligando alostérico puede tener un efecto importante sobre la unión del ligando ortostérico en algunas circunstancias, podría tener mínimo efecto o ninguno en otras, porque el fenómeno alostérico es dependiente de la prueba (Kollias-Baker y cols., 1994).

Una vez que se sospecha que una molécula podría ser un agente alostérico, hay varios métodos disponibles para cuantificar la interacción (Christopoulos, 2002; Kostenis y Mohr, 1996):

A. Prueba de proporción de afinidad. Este procedimiento fue desarrollado para detectar y proveer estimaciones semicuantitativas de la cooperatividad del agente alostérico en ensayos de unión en el equilibrio. En esencia, el procedimiento involucra la determinación de la proporción de las afinidades aparentes de un ligando ortostérico en presencia y en ausencia de una concentración fija del modulador.

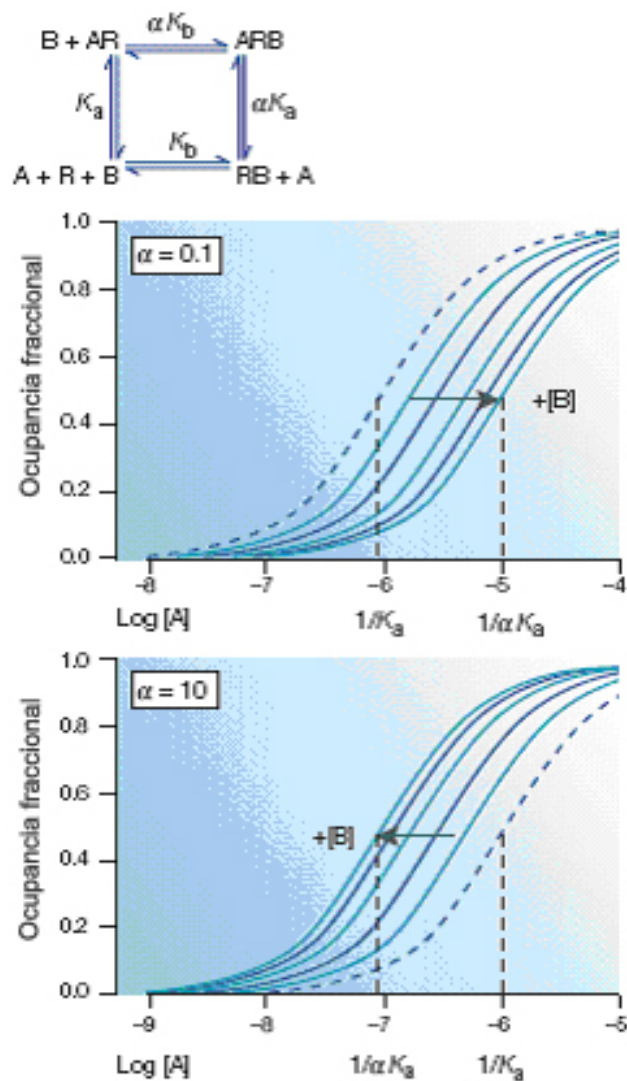


Figura 16. El modelo del complejo terciario de la interacción alostérica. En este modelo, el modulador alostérico, B, se une a un sitio que es topográficamente distinto del sitio ortostérico que es ocupado por el ligando A. B modifica la afinidad de A hasta un límite que es determinado por el factor de cooperatividad, α , el cual caracteriza la fuerza de la interacción entre los sitios alostéricos y ortostéricos. Las gráficas muestran el efecto de B sobre A cuando la afinidad del ligando es incrementada ($\alpha = 10$) o disminuida ($\alpha = 0.1$) por un factor de 10.

B. Ensayos para evaluar la velocidad de asociación/disociación de un radioligando (estudios cinéticos no en el equilibrio). Las velocidades de asociación y disociación de un ligando a su sitio de unión (sea éste ortostérico o alostérico) en un receptor son procesos exponenciales y son indicadores muy sensibles de la interacción del ligando con una conformación particular del receptor. El procedimiento implica obtener experimentalmente las velocidades que gobiernan la asociación (k_{on}) y la disociación (k_{off}) del ligando en función del tiempo.

Ante estas dos opciones, en este trabajo se decidió utilizar la prueba de proporción de afinidades. Se evaluó la inhibición de la fijación del radioligando mediada por el carbacol en presencia y en ausencia de una concentración fija de la succinamida ($1\mu\text{M}$). Como se puede observar en la **Fig. 15**, no se observó cambio en la afinidad del carbacol a las membranas de hipocampo; este hallazgo llevó a suponer que el compuesto, en caso de que sí se estuviera uniendo al sitio alostérico, se estuviera comportando como un modulador alostérico neutral. En otras palabras, que la succinamida se une al sitio alostérico sin afectar la afinidad del ligando ortostérico. Sin embargo, puede existir la posibilidad de un efecto directo sobre el acoplamiento a la proteína G o de que no se esté uniendo al RM.

Aún cuando los ensayos de unión de radioligando son capaces de medir interacciones alostéricas, los ensayos pueden necesitar modificaciones para asegurar la probabilidad máxima de detección. Aunque el MCT describe el fenómeno alostérico en términos de cambios en la afinidad de unión del ligando ortostérico, algunos mecanismos alostéricos pueden

también involucrar cambios en la eficacia del ligando más que cambios directos sobre la afinidad. Para los canales iónicos operados por ligando, esto involucra un efecto sobre el estado de cierre/apertura del canal; para los RAPG, el corolario podría ser un efecto directo sobre el acoplamiento a la proteína G y/o isomerización del receptor a un estado activo (Christopoulos, 2002; Espinoza-Fonseca y Trujillo-Ferrara, 2005; Jakubík y cols., 1996:).

En estudios recientes sobre el receptor M_1 se ha mostrado la existencia de tres sitios alostéricos que están involucrados no sólo en la cooperatividad positiva con el sitio ortostérico, sino también en la activación del acoplamiento a la proteína G por una vía independiente de la unión de la ACh al sitio ortostérico (Espinoza-Fonseca y Trujillo-Ferrara, 2005). Ante este hecho, es obvia la necesidad de experimentos adicionales enfocados a encontrar o esclarecer este posible efecto

Una alternativa para los ensayos que valoran la unión de radioligandos en el equilibrio, que detecta y cuantifica el fenómeno alostérico, es aquella que explota el hecho de que los cambios conformacionales del receptor inducidos por un modulador alostérico llevan a cambios en la velocidad de la asociación y disociación del ligando ortostérico. Es bien conocido que los efectos alostéricos sobre la cinética de unión de ligandos ortostéricos son frecuentemente indicadores más sensibles de mecanismos alostéricos que efectos sobre las propiedades de unión en el equilibrio (Lazareno y cols. 1995). Por ejemplo, la cooperatividad neutral puede resultar en unión ortostérica inalterada en el equilibrio, pero mediciones de cinética de

disociación ortostérica pueden aún revelar que un mecanismo alostérico puede estar presente (Kostenis y Mohr, 1996). Así, los programas de desarrollo de fármacos que específicamente tienen moduladores alostéricos como blanco, deberían considerar ensayos de validación secundarios basados en mediciones de la velocidad de disociación de radioligando (Christopoulos, 2002).

En comparación con la unión de radioligando, los ensayos funcionales de receptores no habían sido usados tan frecuentemente, sin embargo, esto ahora ha cambiado por el advenimiento de tecnologías nuevas y mejores. La ventaja de usar un ensayo que valore la función del receptor como un cernimiento primario, es que el efecto fisiológico final deseado es determinado directamente. Otra ventaja de usar pruebas funcionales para detectar ligandos alostéricos es la habilidad del ensayo para proveer lecturas sensibles para fármacos que modifiquen la eficacia de ligandos ortostéricos. Un ejemplo de prueba funcional sería cuantificar la formación de segundos mensajeros (Christopoulos, 2002).

10. RESULTADOS CONDUCTUALES

10.1. MODELO DE APRENDIZAJE DE TIPO AUTO-MOLDEAMIENTO

En este modelo se usó como un índice de retención, el porcentaje de la RC (% RC) registrado en la tercera sesión de entrenamiento, expresado como la media \pm EE (Meneses, 2002). La dosis de ESC usada se escogió en base a reportes previos donde se observó efecto sobre la memoria a dosis que oscilaron entre 0.2 - 2.0 mg/kg.

En la **Fig. 17** se muestra que la administración de ESC resulta en una reducción significativa en el % RC al compararse con el vehículo y los diferentes grupos de tratamiento, [F (4,32) = 10.96, $p < 0.01$]. En la misma figura se puede observar que tanto la GAL como los derivados del *p*-aminofenol no modifican por si mismos el % deRC.

En la **Fig. 18** se observa que tanto la GAL como diferentes dosis de la succinamida de *p*-aminofenol (1.25, 2.5, 5 y 10 mg/kg) bloquean la acción de la ESC, [F (6,48) = 15.38, $p < 0.01$]. En esta misma figura se puede observar que existe diferencia estadísticamente significativa entre la dosis de 2.5 mg/kg y el grupo control.

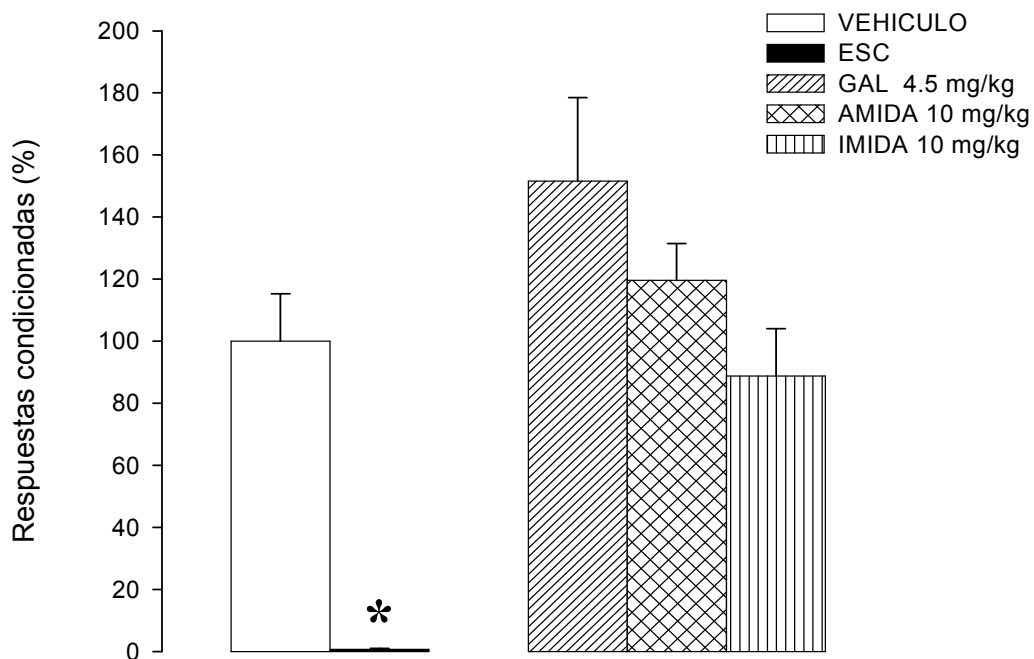


Figura 17. Efecto de la administración i.p de los compuestos usados en este trabajo en el modelo de auto-moldeamiento. Cada barra representa la media \pm E.E. de 8 animales. Escopolamina (ESC), galantamina (GAL). * $p < 0.01$ vs. los demás grupos.

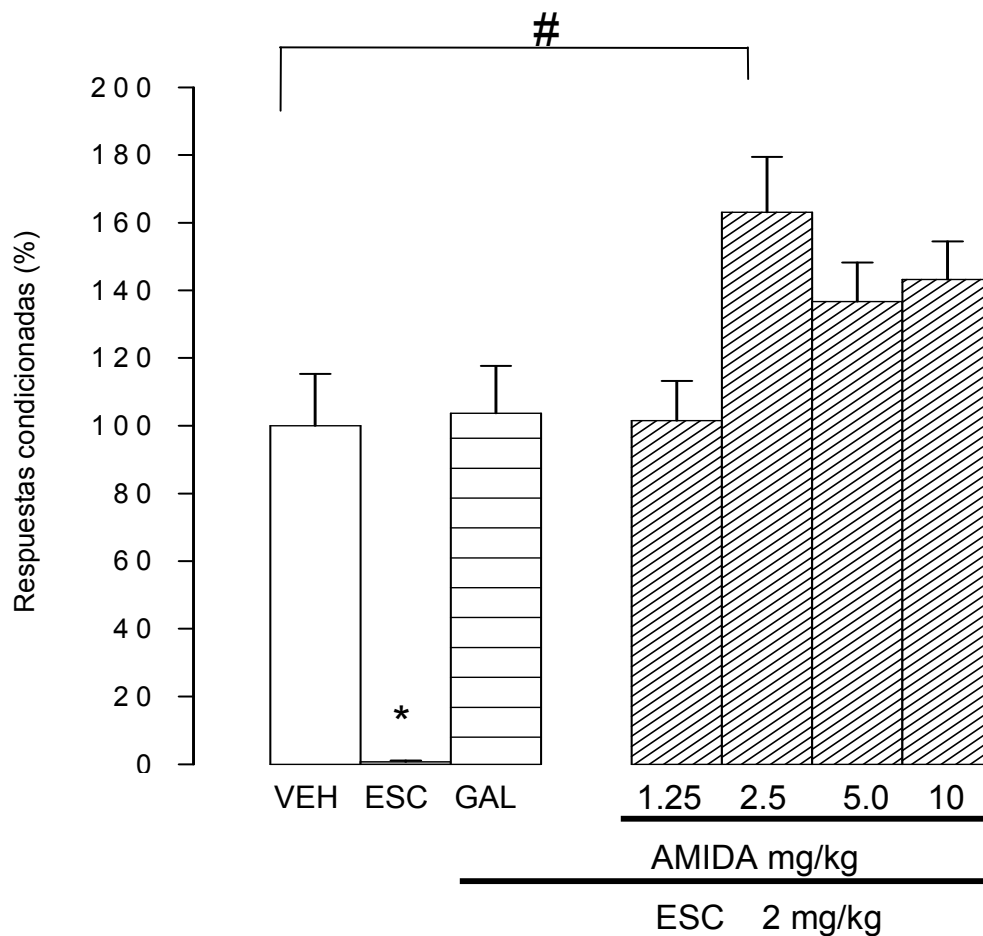


Figura 18. Inhibición de la amnesia inducida por escopolamina tras la administración i.p de dosis crecientes de la succinamida de p-aminofenol. Cada barra representa la media \pm E.E. de ocho animales. Vehículo (VEH), escopolamina (ESC), galantamina (GAL). * $p < 0.01$ vs. todos; # $P < 0.05$.

La **Fig. 19** muestra sólo el efecto de la administración de 10 mg/kg de la succinimida acetilada de *p*-aminofenol porque a esta dosis, a pesar de ser la más alta de las dosis utilizadas, no se bloqueó el efecto de la administración de ESC.

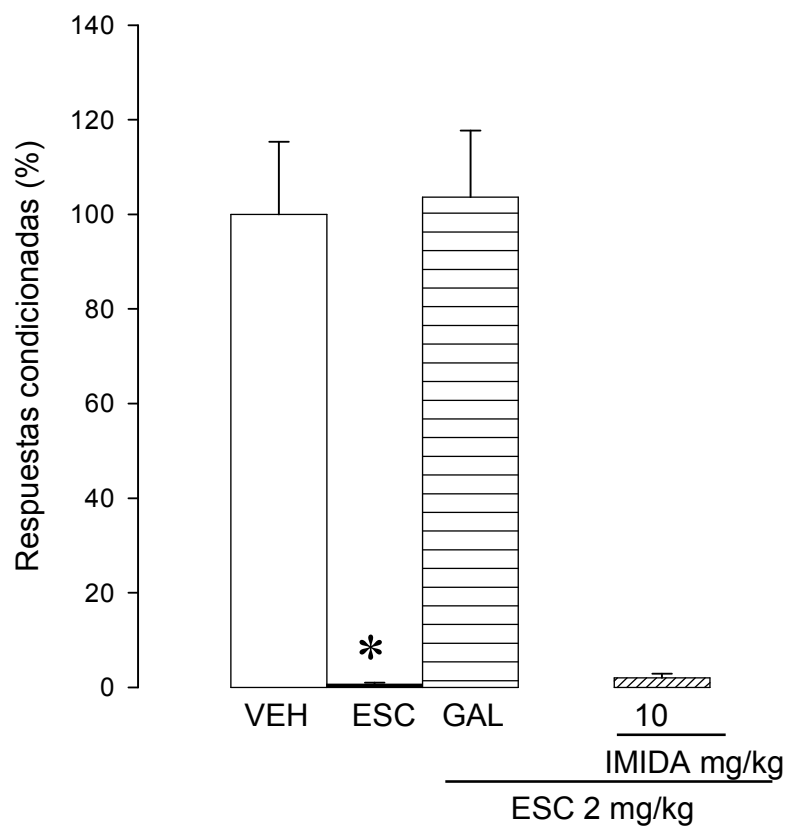


Figura 19. Efecto de la administración *i.p* de la succinimida acetilada de *p*-aminofenol en el modelo de auto-moldeamiento. Cada barra representa la media \pm E.E. de 8 animales. Vehículo (VEH), escopolamina (ESC), galantamina (GAL). * $p < 0.01$ vs. VEH o GAL + ESC.

10.2. LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE T (LET)

El LET tiene como mecanismo subyacente el aprendizaje de una respuesta de evitación inhibitoria (pasiva) a los brazos abiertos (De-Mello y Carobrez, 2002). En la sesión de entrenamiento se valoró el número de ensayos necesarios para adquirir la respuesta de evitación inhibitoria (REI). Los resultados del ANOVA para los datos obtenidos en la primera sesión, muestran diferencia significativa entre los grupos en el número de ensayos necesarios para adquirir la REI durante la sesión de entrenamiento [$F(7, 88) = 3.3$; $p < 0.01$]. El análisis *post-hoc* muestra que aunque en todos los grupos se observa aprendizaje, las ratas pretratadas con 10 mg/kg de la imida requieren significativamente menos ensayos cuando se compara contra el VEH (**Fig. 20**).

En la **Tabla 3** se muestra la frecuencia de ensayos para los diferentes tratamientos. Al realizarse el análisis estadístico de los índices de riesgo se observó que no hay diferencia significativa entre los tratamientos (**Tabla 4**).

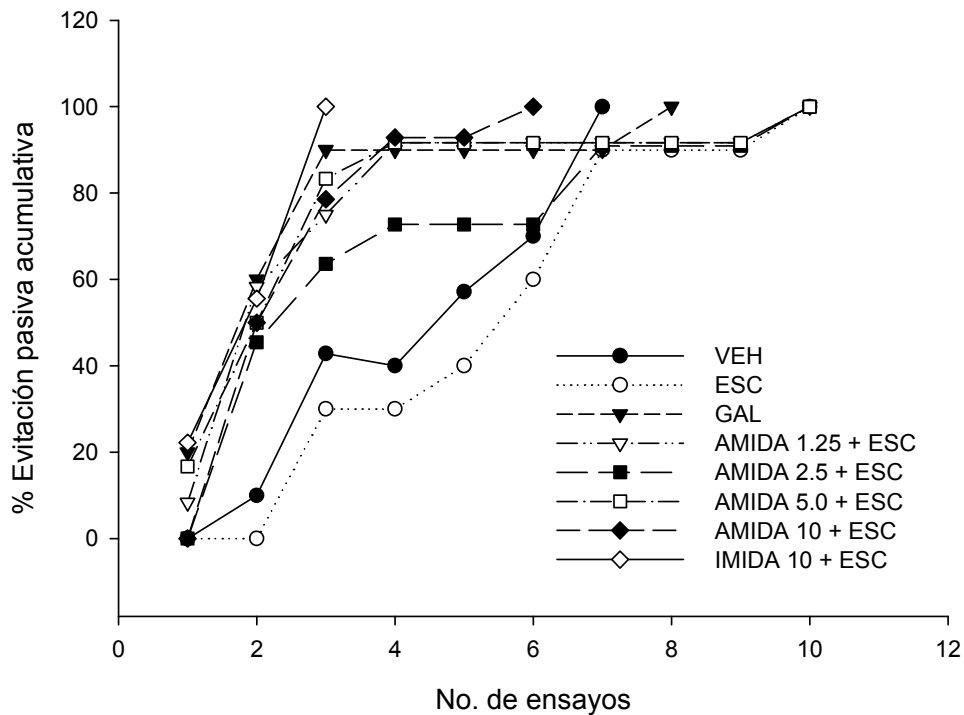


Figura 20. Efecto de la administración de los diferentes compuestos utilizados en ratas sometidas a la sesión de entrenamiento en el LET. La gráfica representa el porcentaje acumulativo de animales que alcanzan el criterio de permanecer 300s en el brazo cerrado (adquisición de la respuesta de evitación inhibitoria) en la sesión de entrenamiento.

En la sesión de prueba, realizada 72 h después de la sesión de entrenamiento, se detectó una reducción significativa en la latencia para dejar el brazo cerrado en el grupo tratado con ESC [$F(7,88) = 4.8$, $p < 0.01$] (**Fig. 21**). Además se observó que todos los tratamientos revirtieron el efecto de la ESC, pero sin diferencia significativa entre ellos.

Tratamiento	Frecuencia de ensayos (media \pm EE)
Vehículo	5.1 \pm 0.6
ESC	5.7 \pm 0.7
GAL	2.7 \pm 0.6
AMIDA 1.25 + ESC	3.0 \pm 0.7
AMIDA 2.5 + ESC	4.0 \pm 0.8
AMIDA 5 + ESC	3.1 \pm 0.7
AMIDA 10 + ESC	5.3 \pm 1.2
IMIDA 10 + ESC	2.2 \pm 0.3*

Tabla 3. Frecuencia de ensayos en la sesión de entrenamiento en ratas sometidas al LET. Los datos se presentan como la media \pm EE, * p <0.01 vs. VEH.

Tratamiento	Índice de Riesgo (media \pm EE)*
Vehículo	0.52 \pm 0.02
ESC	0.30 \pm 0.02
GAL	0.72 \pm 0.03
AMIDA 1.25 + ESC	0.63 \pm 0.02
AMIDA 2.5 + ESC	0.66 \pm 0.01
AMIDA 5 + ESC	0.55 \pm 0.03
AMIDA 10 + ESC	0.52 \pm 0.02
IMIDA 10 + ESC	0.75 \pm 0.01

Tabla 4. Evaluación de riesgo en la sesión de entrenamiento en ratas sometidas al LET. Los datos se presentan como la media \pm EE, * p = NS

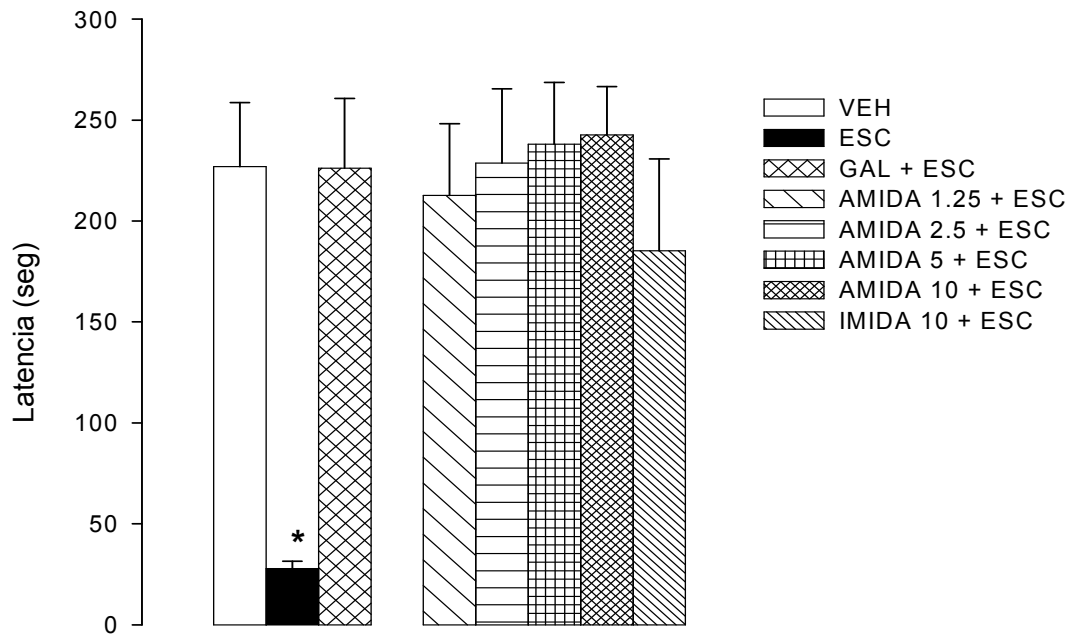


Figura 21 . Efecto de la administración de los diferentes compuestos utilizados en ratas sometidas a la sesión de prueba en el LET. El histograma representa la media \pm EE del tiempo empleado en dejar el brazo cerrado durante la sesión de prueba, 72 h después de la sesión de entrenamiento. * $P < 0.01$ vs. todos.

10.3. PRUEBA DE ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

Esta prueba detecta tanto la movilidad total que tenga el animal durante el tiempo de experimentación así como la actividad ambulatoria. Los resultados se presentan como la media \pm EE del número de cuentas en 5 minutos de la actividad ambulatoria. El análisis estadístico de los datos mostró que no hay diferencia significativa entre los diferentes grupos de tratamiento [$F(7,77) = 2.1, p > 0.05$]. La dosis de 2 mg/kg de ESC no produjo efectos sobre la actividad locomotriz de los animales y no interfirió con las pruebas porque es administrada al final de la sesión de entrenamiento. (Fig.22)

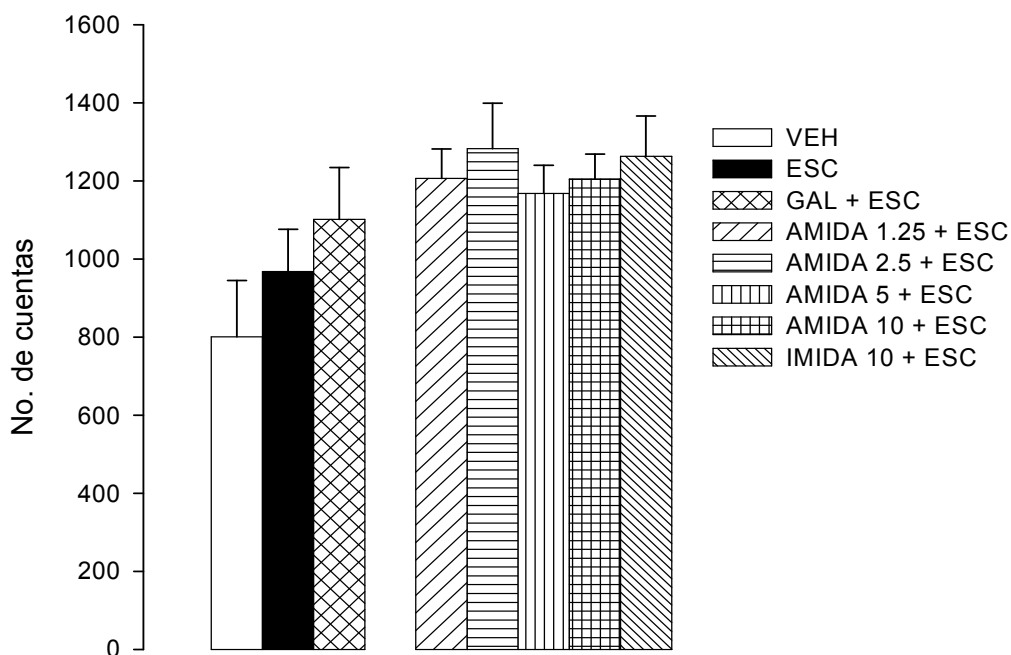


Figura 22. Efecto de la administración de los diferentes compuestos utilizados sobre la actividad espontánea. Cada barra representa la media \pm EE de 10 animales. $p = NS$

10.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS CONDUCTUALES

La EA es un proceso neurodegenerativo, lento y progresivo, caracterizado por un deterioro lento de las funciones cognitivas e intelectuales, que se traduce en pérdida de la memoria e incapacidad del individuo afectado para realizar por sí mismo las actividades vitales rutinarias. Si bien la etiología de la EA no está todavía claramente definida, se sabe que en su fisiopatología están implicadas diversas alteraciones histopatológicas, entre las que cabe destacar una marcada atrofia de la corteza cerebral (con pérdida de neuronas corticales y subcorticales), la formación de las llamadas “placas seniles” (consistentes en acumulaciones de β -amiloide) y degeneraciones neuríticas con ovillos neurofibrilares. El deterioro cognitivo de los pacientes presenta buena correlación con la presencia y número de estas alteraciones, que son particularmente notables en el hipocampo y en zonas asociativas de la corteza cerebral, mientras que la pérdida neuronal afecta en concreto a las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert (Maccioni y cols., 2001; Terry y Buccafusco, 2003).

Como resultado del deterioro destacado de la neurotransmisión colinérgica en la EA, se llegó al desarrollo de la *hipótesis colinérgica* de la disfunción cognitiva geriátrica (Bartus y cols., 1982). Apoyándose en esta teoría, un gran número de estudios se han enfocado en la manipulación de la función colinérgica en animales de experimentación en un esfuerzo para elucidar el papel del sistema colinérgico en los procesos de memoria y aprendizaje (Bartus y cols., 1982, 1985; Smith, 1988). Existe evidencia de que el

tratamiento sistémico con antagonistas muscarínicos tales como ESC y atropina alteran el desempeño de animales de experimentación en una amplia variedad de pruebas, incluyendo la de evitación inhibitoria (pasiva), pruebas de memoria de asociación y no asociación operante de sucesos, y en laberintos tales como el laberinto en agua de Morris y el de brazos radiales (Decker y McGaugh, 1991).

La distribución de los subtipos de RM en el cerebro sugiere que el subtipo M_1 puede ser particularmente importante para modular procesos cognitivos, ya que este receptor es el más abundante en áreas del cerebro anterior tales como el neostriado, el hipocampo y la corteza cerebral donde las sinapsis colinérgicas parecen mediar la adquisición y el almacén de nueva información (Shinoe, 2005; Van der Zee y Luiten, 1999). Aunque han sido usados estudios con lesiones del cerebro basal anterior para inducir deterioro cognitivo en animales de experimentación (Hepler y cols. 1985; Olton, 1995), se ha encontrado que el bloqueo colinérgico produce una alteración de la adquisición de la memoria y amnesia retrógrada en varias especies animales y en diferentes pruebas de memoria y aprendizaje (Aigner y cols., 1991; Ridley y cols., 1984; Roldán y cols. 1997; Spangler y cols., 1989; Vanderwolf, 1991). Con base en lo anterior, una herramienta farmacológica para evaluar el posible efecto cognitivo de nuevas moléculas valoraría su habilidad para revertir o bloquear la amnesia inducida por ESC.

Tomando en cuenta lo anterior y considerando que los derivados de *p*-aminofenol son análogos estructurales sintéticos de la ACh, así como su

posible acoplamiento con el receptor M_1 , se consideró necesario evaluar su efecto sobre la amnesia inducida con ESC en dos modelos de memoria y aprendizaje.

El aprendizaje de tipo auto-moldeamiento requiere una red neuronal intacta en el hipocampo, septum y corteza, así como la participación de las vías de transducción colinérgicas en la integración de las habilidades cognitivas auto-aprendidas (Meneses, 2003; Meneses y Hong, 1999; Van der Zee y Luiten, 1999). Además, comparado con otras pruebas tiene ventajas como son: a) un aprendizaje asociativo entre la palanca y la entrega de comida, así como con la RC y la entrega de comida (lo cual permite establecer un aprendizaje de tipo clásico e instrumental); b) permite estudiar por separado los efectos de los fármacos sobre el aprendizaje, la ingesta y la conducta motora; c) sus resultados son reproducibles, sensibles a la facilitación y/o bloqueo del aprendizaje inducido por medios farmacológicos o biológicos; d) no requiere estimulación aversiva; e) como es automatizado, requiere de una manipulación mínima del animal. Y permite determinar los efectos de la manipulación farmacológica en las fases de estudio de los procesos cognitivos: adquisición, consolidación y recuperación, dependiendo del momento en el que sea administrado el fármaco (Meneses, 2003).

La tarea de auto-moldeamiento ha sido descrita previamente. El incremento o disminución en el % RC fue considerado como indicador del aumento o disminución del aprendizaje, respectivamente. La administración de ESC al final de la primera sesión resultó en reducción

significativa del % RC en la tercera sesión, al compararse con los diferentes grupos de tratamiento, sugiriendo bloqueo de la consolidación de la memoria. Los resultados indican que la administración de la succinamida, pero no de la succinimida, revierte la amnesia inducida por ESC. Además, se pudo observar que la dosis de 2.5 mg/kg de la succinamida no sólo bloqueó el efecto de la ESC sino que hubo un aumento significativo en el % RC respecto al control. Tomando en cuenta que el compuesto se administró antes del inicio de la primera sesión, se puede sugerir que hay una facilitación de la adquisición de la memoria a esa dosis.

El condicionamiento al miedo es un modelo de memoria y aprendizaje de tipo “evitación pasiva” (De-Mello y Carobrez, 2002; Dityatev y Bolshakov, 2005). Aunque hay diferencias en la naturaleza de las características neurofisiológicas subyacentes en los modelos de evitación activa o pasiva la evaluación general de aprendizaje y memoria es una constante. El LET fue descrito por primera vez por Graeff y cols. (1993) y deriva del laberinto elevado, un modelo animal de ansiedad. Exposiciones repetidas al LET induce en el animal el aprendizaje de una evitación inhibitoria (pasiva) a los brazos abiertos (por ejemplo, aumento de latencia para dejar el brazo cerrado en varios ensayos consecutivos), la cual está etológicamente basada en la aversión experimentada en estos animales cuando se exponen a lugares no protegidos (respuesta de evitación inhibitoria pasiva aprendida) (Graeff y cols., 1998). La adquisición de la evitación inhibitoria en el LET está representada por una curva de aumento de aprendizaje hasta que el criterio de evitación es alcanzado. La presencia de la conducta

de evaluación de riesgo hacia los brazos abiertos estando en los brazos cerrados en la sesión de entrenamiento, indica una creciente reunión de información para disminuir los conflictos o vacilaciones con respecto al ambiente (Bertoglio y Carobrez, 2000; Sanson y Carobrez, 1999). Esto sugiere que el tiempo gastado dentro del brazo cerrado no representa habituación o pérdida o falta de motivación para explorar, sino una respuesta de evitación inhibitoria aprendida.

Como sucedió en la prueba de automoldeamiento, en el LET la administración de ESC al final de la sesión de entrenamiento alteró la recuperación de la información en la sesión de prueba. Sin embargo, se encontró que los dos derivados del *p*-aminofenol (a las diferentes dosis usadas) bloquearon el efecto de la ESC aunque sin diferencia significativa entre ellos. Además, se pudo observar una disminución del número de ensayos para alcanzar el criterio de evitación tras la administración de la dosis alta de succinimida lo que sugiere una facilitación de la adquisición de la información. Finalmente, no se encontró diferencia significativa entre los diferentes tratamientos en la conducta de evaluación de riesgo, lo que sugiere que el tiempo que estuvieron los animales en el brazo cerrado no representa una falta de motivación para explorar o por alguna alteración en su actividad locomotriz.

Si los derivados del *p*-aminofenol tienen similitud estructural con la ACh, se esperaba que interaccionarán con receptores colinérgicos y por lo tanto, resultados similares en los dos modelos de memoria y aprendizaje. No obstante, en el modelo de auto-moldeamiento se encontró que solo la

succinamida bloqueó el efecto de la ESC. En un intento de dar una explicación simple, podríamos tomar en cuenta los datos obtenidos de las simulaciones de acoplamiento. En éstas se encontró que ambos derivados se unían con menor afinidad al receptor M_1 que la ESC, por lo que se podría explicar el por que la imida no bloquea su efecto; sin embargo, la amida al unirse al sitio alostérico podría alterar la afinidad de la ACh por el receptor, ejercer un efecto directo sobre el acoplamiento a la proteína G y/o isomerización del receptor a un estado activo y de esta manera bloquear el efecto de la ESC. No obstante, esta hipótesis supone resultados similares con el uso del LET, por lo que es necesario realizar mas experimentos encaminados a apoyar estas ideas.

Es bien conocido que la amígdala, la neocorteza y el hipocampo son regiones meta del sistema cerebral frontal basal colinérgico, que se relaciona estrechamente con diversas funciones del aprendizaje y la memoria (Van der Zee y Luiten, 1999). La prueba de auto-moldeamiento se sabe es hipocampo-dependiente. Si además consideramos que el receptor M_1 muestra expresión más fuerte en la región CA1 y que regula la transmisión sináptica en esta zona y suponiendo que la succinamida realmente se estuviera comportando como un modulador alostérico del RM M_1 , se podría sugerir que la succinamida está ejerciendo su efecto a este nivel.

En contraste con lo anterior, el LET es una prueba en la que se aprende una respuesta de evitación inhibitoria pasiva y la estructura neuroanatómica que regula la entrada de la información es la amígdala.

La amígdala, una estructura límbica conformada por varios núcleos con numerosas conexiones recíprocas con otras estructuras límbicas y la corteza, participa en los procesos de la memoria emocional al reforzar el contenido de memoria (Dityatev y Bolshakov 2005; Maren, 2001; Van der Zee y Luiten, 1999). En diferentes estudios se ha demostrado que la lesión de la amígdala afecta la adquisición de conductas discriminativas de evitación y de condicionamiento al miedo; además hay suficientes datos en la literatura que sugieren que las proyecciones de la amígdala hacia el hipocampo y la corteza entorrinal podrían regular la realización de la prueba de evitación pasiva a través de RM (McGaugh y cols., 1996; Richter-Levin, 2004; Riekkinen y cols., 1993; Van der Zee y Luiten, 1999).

No hay evidencia clara sobre cual de los subtipos de RM está involucrado en la consolidación de la memoria en la amígdala. Hay estudios en los que se reporta la presencia de los receptores M_1 y M_3 (Fornari y cols., 2000; Van der Zee y Luiten, 1999), sin embargo, el bloqueo colinérgico con ESC no permite distinguir cual subtipo de receptor está involucrado con el aprendizaje de una respuesta de evitación inhibitoria. Algunos experimentos usando bloqueadores selectivos M_1 han mostrado alteración de la adquisición de la REI, pero los resultados obtenidos difieren de aquellos observados en lesiones de la amígdala y en contraste se parecen más a los observados en pruebas hipocampo-dependientes (Fornari y cols., 2000; Riekkinen y cols., 1993). Ante esta evidencia y los resultados de este trabajo, tenemos dos posibilidades: a) que la función hipocámpica sea más susceptible al bloqueo por manipulación colinérgica del receptor

M1 que la amígdala; b) que los RN y otros subtipos de RM, junto con el receptor M_1 , puedan estar involucrados en la adquisición del condicionamiento al miedo dependiente de la amígdala.

Finalmente, los resultados obtenidos en las pruebas de memoria y aprendizaje muestran que los derivados de *p*-aminofenol bloquearon el efecto amnésico inducido por la ESC en los dos modelos animales de memoria y aprendizaje utilizados. Los datos también sugieren que a pesar de que es obvia la participación del sistema colinérgico en la modulación de la adquisición de la información en ambos modelos, podrían estar implicados diferentes subtipos de RM y/o RN. Lo anterior, junto con los resultados obtenidos en las pruebas farmacológicas hace obvia la necesidad de experimentos tanto “funcionales” de receptores muscarínicos, como de simulaciones de acoplamiento en los diferentes subtipos de RM, con el objetivo de esclarecer estos hallazgos.

11. CONCLUSIONES

Los compuestos presentados en este trabajo se sintetizaron sin utilizar disolventes originando una reacción exergónica, colorida, cuantitativa, barata e inocua para el ambiente.

Los compuestos no desplazan la unión de la [³H]NMS a las membranas de hipocampo.

La observación de que la amida se une al sitio alostérico en el receptor M1 junto con los resultados en las pruebas de unión de radioligando, sugiere que su cooperatividad con el ligando ortostérico es neutral.

La administración de ESC inmediatamente al final de la sesión de entrenamiento bloquea la consolidación de la memoria en ambos modelos de memoria y aprendizaje.

El pretratamiento con ambos derivados a la dosis más alta utilizada, no modifica por si mismo el %RC en el modelo de auto-moldeamiento. Sin embargo, los datos sugieren que la dosis de 2.5 mg/kg de la amida facilita la adquisición de la información en este modelo.

La amida, pero no la imida, bloquea el efecto de la ESC en un modelo de aprendizaje dependiente de hipocampo (auto-moldeamiento).

Tanto la amida como la imida bloquean el efecto de la ESC en el modelo de aprendizaje dependiente de la amígdala (LET). Así mismo, los datos de

la sesión de entrenamiento sugieren que la dosis de 10 mg/kg de la imida facilita la adquisición de información en este modelo.

Los resultados de este estudio sugieren que la succinamida y la succinimida acetilada de *p*-aminofenol son activos en el modelo experimental de amnesia inducida por ESC y que poseen actividad colinérgica in vivo.

Los datos derivados de este estudio pueden ser útiles para validar el modelo del LET.

12. PERSPECTIVA

El desarrollo moderno de fármacos frecuentemente involucra investigar la habilidad que tienen las moléculas para unirse a un blanco preseleccionado. Un objetivo de la síntesis orientada a un blanco es la obtención de un grupo de moléculas pequeñas capaces de perturbar alguna vía biológica relacionada con alguna enfermedad, llevando eventualmente a la identificación de blancos terapéuticos capaces de ser modulados por moléculas pequeñas. Dado que las interacciones alostéricas representan un mecanismo por el cual moléculas pequeñas pueden ejercer efectos profundos en proteínas grandes, los programas de desarrollo de fármacos no deberían descartar las investigaciones para ligandos alostéricos como compuestos líderes.

Hay al menos tres ventajas generales al usar moduladores alostéricos para generar o modificar una respuesta fisiológica en comparación a los fármacos ortostéricos clásicos. La primera ventaja es que el efecto del modulador alostérico es saturable; una vez que los sitios alostéricos están completamente ocupados, no se observa más el efecto alostérico. Este efecto de saturabilidad se aplica tanto a los moduladores alostéricos positivos como negativos. Una segunda ventaja, especialmente relacionada con los moduladores alostéricos positivos, se relaciona con su habilidad para selectivamente alterar respuestas en tejidos en los cuales el agonista endógeno ejerce sus efectos fisiológicos; es decir, se espera que el modulador agonista ejerza su efecto sólo cuando el agonista endógeno esté presente. La tercera ventaja es la selectividad potencial a un subtipo

de receptor. Así, un agente alostérico puede mostrar cooperatividad positiva con el ligando endógeno en un solo subtipo de receptor, y al mismo tiempo cooperatividad neutral con los otros subtipos. Estas ventajas de los moduladores alostéricos pueden llevar a regímenes terapéuticos novedosos que provean el máximo beneficio con efectos adversos mínimos.

13. BIBLIOGRAFÍA

Aguado AL (2001). Learning and memory. *Rev Neurol.* 32: 373-381.

Aigner TG, Walker DL, Mishkin M (1991). Comparison of the affects of scopolamine administered before and after acquisition in a test of visual recognition memory in monkeys. *Behav Neural Biol.* 55: 61-67.

Angelo A, Fagnoni M (2004). Green Chemistry and photochemistry were born at the same time. *Green Chem.* 6: 1-6.

Bachurin, SO (2003). Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 23(1): 48-88.

Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217: 408-417.

Bartus RT, Dean RL, Pontecorvo MJ, Flicker C (1985). The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Ann NY Acad Sci.* 444: 332-358.

Bertoglio LJ, Carobrez AP (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav Brain Res.* 108: 197-203.

Bigl V, Arendt T (1991). Cholinergic neurons of the central nervous system: morphofunctional aspects. *Acta Psychiatr Scand.* 366 (suppl): 7-13.

Bigl V, Woolf NL, Butcher LL (1982). Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res Bull.* 8: 727-749.

Bikádi Z, Simonyi M (2003). Muscarinic and nicotinic cholinergic agonist: structural analogies and discrepancies. *Curr Med Chem.* 10: 1241-1253.

Bliss T V P, Collingridge G L.(1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

Brown PL, Jenkins HM (1968). Auto-shaping of the pigeon's key-peck. *Journal of the Experimental Analysis of behavior.* 11: 1-8.

Burgen, ASV (1995). The background of the muscarinic system. *Life Sci.* 56: 801-806.

Byrne HJ (1997). Plastic Plasticity. *Nature.* 389: 791-792.

Caulfield MP, Birdsall NJM (1998). International Union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev.* 50: 279-290.

Christopoulos A (2002). Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drugs discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 198-210.

Clark AL, Mitchelson F (1976). The inhibitory effects of gallamine on muscarinic receptors. *Br J. Pharmacol.* 58: 323-331.

Clark RE, Manns JR, Squire LR (2002). Classical conditioning, awareness and brain systems. *Trends Cogn Sci.* 6: 524-31.

Decker MW, McGaugh JL (1991). The role of interactions between the cholinergic systems and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 7: 151-158.

De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz, RJ (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled b-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 255: 7108-7117.

De-Mello N, Carobrez AP (2002). Elevated T-maze as an animal model of memory: effects of scopolamine. *Behav Pharm.* 13: 139-148.

Deneris ES, Connolly J, Rogers SW, Duvoisin R (1991). Pharmacological and functional diversity of neural nicotinic acetylcholine receptors. *TIPS.* 12: 34-40.

Dityatev AE, Bolshakov VY (2005). Amygdala, long-term potentiation, and fear conditioning. *The neuroscientist.* 11: 75-87.

Eckenstein FP , Baughmann RW, Quinn J (1988). An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 25: 457-474.

Eglen, RM, Choppin, A, Watson, N (2001). Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci.* 22: 409-413.

Espinosa-Raya J, Espinoza-Fonseca M, Picazo O, Trujillo-Ferrara J (2006) Effect of a M1 allosteric modulator on scopolamine-induced amnesia. *Med Chem.* En prensa.

Espinoza-Fonseca M, Trujillo-Ferrara J (2005). Identification of multiple allosteric sites on the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Letters.* 579, 6726-6732.

Felder, CC, Bymaster, FP, Ward, J, DeLapp N (2000). Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem.* 43: 4333-4353.

Fisher A, Brandeis R, Bar-Ner RHN, Kliger-Spatz M, Natan N, Sonogo H, Marcovich I, Pittel Z (2002) AF150s and AF267B. M1 muscarinic agonists as innovative therapies for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 19, 145-153.

Fornari RV, Moreira KM, Oliveira MGM (2000). Effects of the selective M1 muscarinic receptor antagonist dicyclomine on emotional memory. *Learn Mem.* 7: 287-292.

Gaykema RPA, Gaál G, Traber J, Hersh LB, Luiten PGM (1991). The basal forebrain cholinergic system: efferent and afferent connectivity, and long-term effect of lesions. *Acta Psychiat Scand.* 366: 14-26.

Gómez-Pérez E, Ostrosky-Solís F, García P (2003). The development of attention, memory and the inhibitory processes: the chronological relation with the maturation of brain structure and functioning. *Rev Neurol.* 37: 561-67.

Gotti C, Fornasari D, Clementi F (1997) Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobio.* 53: 199-237.

Graeff FG, Viana MB, Tomaz C (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effects of diazepam. *Brazilian J M Biol Res,* 26: 67-70.

Graeff FG, Netto H, Zangrossi (1998). The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 23: 237-246.

Hepler DJ, Wenk GL, Cribbs BL, Olton DS, Coyle JT (1985). Memory impairments following basal forebrain lesions. *Brain Res.* 347: 1-5.

Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol.* 30, 633-673.

Hulme EC, Lu ZL, Saldanha JW, Bee MS (2003). Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans.* 31: 29-34.

Israel, M., Lesbats, B. and Bruner, J. (1993) Glutamate and acetylcholine release from cholinergic nerve terminals, a calcium control of the specificity of the release mechanism. *Neurochem Int.* 22, 53-58.

Jakubík J, Bačáková L, Lisá V, El-Fakahany EE, Tuček S (1996). Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding sites. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 93: 8705-8709

Kandel, ER (2001a). Aprendizaje y memoria. En: Principios de neurociencias. Eds. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 4^a Ed. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid, España. pp 1227-1246.

Kandel, ER (2001b). Mecanismos celulares del aprendizaje y sustrato biológico de la individualidad. En: Principios de neurociencias. Eds. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 4^a Ed. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid, España. pp 1247-1279

Karlin A (1967). On the application of “a plausible model” of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *J Theor Biol.* 16: 306-320.

Kollias-Baker C, Bruns RF, Ruble J, Demis D, Linden J, Belardinelli, L (1994). Allosteric enhancer PD81,723 acts by novel mechanism to potentiate cardiac actions of adenosine. *Cir Res.* 75: 961-971.

Kostenis E, Mohr K (1996). Composite action of allosteric modulators on ligand binding. *Trends Pharmacol Sci.* 17: 280-283.

Kuntz, ID (1992). Structure-Based Strategies for Drug Design and Discovery. *Science* . 257: 1078-1082.

Lattal M, Abel T (2000). Cellular and Molecular Mechanisms of learning. En: Cerebral Signal Transduction from first to fourth messengers. Martin E.A. Reith Ed. Human Press Inc. EUA. pp 27-72.

Lazareno S, Birdsall NJM (1995). Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabelled ligands at G-protein-coupled receptors: interactions os strychnine and acetylcholine at muscarínico receptors. *Mol Pharmacol.* 48: 362-378.

Léránth C, Frotscher M (1987). Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons. *J Comp Neurol.* 261: 33-47.

Levey, AI (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 13541-13546.

Lynch MA (2004). Long term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 84: 87-136.

Maccioni, RB, Muñoz, JP, Barbeito, L (2001). The molecular bases of Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 32 (2001): 367-381.

Maren S (2001). Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci.* 24: 897-931.

Martínez-Murillo R, Villalba RM, Rodrigo J (1990). Immunocytochemical localization of cholinergic terminals in the region of the nucleus basalis magnocellularis of the rat: a correlated light and electrón microscopio study. *Nueroscience* 36: 361-376.

McDermot AM, Role LW, Siegelbaum SA (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci.* 22: 443-485.

Maelicke A, Schranttenholz A, Samochoki M, Radina M, Albuquerque EX (2000). Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 113: 199-206.

Meneses A, Hong E (1999). 5-HT_{1A} receptors modulate the consolidation of learning in normal and cognitively impaired rats. *Neurobiol Learn Mem.* 71: 207-218.

Meneses, A (2003). A pharmacological analysis of an associative learning task: 5-HT₁ to 5-HT₇ receptor subtypes function on a Pavlovian/instrumental autoshaped memory. *Learn Mem.* 10: 363-372.

Mesulam MM (1995). Cholinergic pathways and the ascending reticular activating system of the human brain. *Ann NY Acad Sci.* 757: 169-79

Metcalf R H, Boegman RJ, Riopelle RJ, Ludwin SK (1988). The release of endogeneous acetylcholine from the medial septum/diagonal band of rat brain. *Neurosci Lett.* 93, 85-90.

Mier A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky S, Kaiseman I, Ahdut R, Demirgoren S, Rahamimoff R (1999). Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev.* 79: 1019-1088.

Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron.* 20: 445-468.

MonmaurP, Puma C, Sharif A (1994). Involvement of M2 and non-M2 muscarinic receptors in hippocampal theta rhythm induced by carbachol infusion into the septum of the rat. *Brain Res.* 656: 199-204.

Monod J, Changeux JP, Jacob, F (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol.* 6: 306 329.

Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965). On the nature of allosrteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol.* 12: 88-118.

MooreE, de Boer P, Auth F, Westerink BHC (1995). Characterization of muscarinic autoreceptors in the septohippocampal system of the rat. *Eur J Pharmacol.* 294: 155-161.

Oki T, Takagi Y, Inagaki S, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Yamada S (2005). Quantitative analysis of binding parameters of [³H]N-methylscopolamine in central

nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Brain Res.* 133, 6-11.

Olton DS (1990). Dementia: animal models of the cognitive impairments following damage to the basal forebrain cholinergic systems. *Brain Res Bull* 25: 499-502.

Riekkinen P, Riekkinen M, Sirvio J (1993). Cholinergic drugs regulate passive avoidance performance via the amigdala. *J Pharmacol Exp Ther.* 267: 1484-1492.

Rouse, ST, Marino, MJ, Potter, LT, Conn, PJ, Levey, AI (1999). Muscarinic receptors subtypes involved in hippocampus circuits. *Life Sci.* 64: 501-509.

Rugg DM, Mark ER, Walla P, Schloerscheidt MA, Birch SC, Allan K. Dissociation of the neural correlates of implicit and explicit memory. *Nature* 392: 595-98.

Ridley RM, Bowes PM, Baker HF, Crow TJ (1984). An involvement of acetylcholine in object discrimination learning and memory in the marmoset. *Neuropsychologia* 22: 253-263.

Sanson LT, Carobrez AP (1999). Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety. *Behav Brain Res.* 101: 9- 64.

Schreiber, SL (2000). Target-Oriented and Diversity-Oriented Organic Synthesis in Drug Discovery . *Science* 287: 1964 1969.

Segal M (1986). Properties of rat medial septal neurons recorded in vitro. *J Physiol.* 379: 309-330.

Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T (2005). Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 25: 11194 11200.

Smith G (1988). Animal models of Alzheimer`s disease: experimental cholinergic denervation. *Brain Res Rev.* 13: 103-118.

Spangler EL, Chachich ME, Curtis NJ, Ingram DK (1989). Age-related impairment in complex maze learning in rats: relationship to neophobia and cholinergic antagonism. *Neurobiol Aging.* 10: 133-141.

Stockton JM, Birdsall NJM, Burgen ASV, Hulme EC (1983). Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol. Pharmacol.* 23: 551-557

Südhof TC (1995). The synaptic vesicle: a cascade of protein interactions. *Nature* 375: 645-653.

Taylor P (2006). Acetylcholine. En: Basic Neurochemistry. Eds. Siegal GJ, Albers RW, Brady St, Price DL. 7^a Ed. Academic Press. Canada. pp 186-209.

Terry, AV, Buccafusco, JJ (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther.* 306: 821-827.

Trujillo, F. J.G., Santillan, R., Beltrán, H. I., Farfán, N., y Höpfl, H. (1999). ¹H and ¹³C NMR spectra for a series of arylmaleamic acids, arylmaleimides, arylsuccinamic acids and arylsuccinimides. *Magn Reson Chem.* 37: 682-686

Trujillo F. J.; Vázquez, I.; Espinosa, J.; Santillan, R.; Farfán, N.; y Höpl, H. (2003). Reversible and irreversible inhibitory activity of succinic and maleic acid derivatives on acetylcholinesterase. *Eur J Pharm Sci.* 18:313-322.

Trujillo-Ferrara, J. Correa-Basurto, J. Espinosa, J. García, F. Martínez. R. Miranda (2005). Solvent-Free Synthesis of Arylamides and Arylimides, Analogues of Acetylcholine. *Synth Comm.* 35 : 2017-2023.

Tuček S, Proška J. (1995). Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16:147 -151

Van der Zee, E.A., Luiten, P.G.M. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol.* 58: 409-471.

Vanderwolf CH (1991). Anti-muscarinic drug effects in a swim-to-platform test: dose-response relations. *Behav Brain Res.* 44: 217-219.

Vertes RP, Kocsis N (1997). Brainstem-diencephalo-septo-hippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81: 893-926.

Wess J, Blin N, Mutschler E, Blüml K (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling. *Life Sci.* 56: 915-922.

Woolf NJ, Eckenstein F, Butcher LL (1984). Cholinergic systems in the rat brain: I. projections to the limbic telencephalon. *Brain Res Bull* 13: 751-784.

Woolf NJ (1991). Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol.* 37: 475-524.

Woolf NJ (1996). The critical role of cholinergic basal forebrain neurons in morphological change and memory encoding: a hypothesis. *Neurobiol Learn Mem.* 66: 258-266.

Effect of a M1 Allosteric Modulator on Scopolamine-Induced Amnesia

J. Espinosa-Raya^{1,*}, M. Espinoza-Fonseca², O. Picazo¹, J. Trujillo-Ferrara¹

FINAL

¹Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación y Departamento de Bioquímica, Plan de San Luis y Díaz Mirón, México, D.F., 11340 México.² Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics, University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, USA

Abstract: It is well accepted that acetylcholine is involved in memory and learning processes and that loss of memory is characteristic of Alzheimer's disease (AD). Several muscarinic agonists have been shown to be clinically effective in the treatment of AD. However, their use has been limited due to adverse side effects. As a result, more selective M1 agonists are expected to be the next generation of agents for the treatment of AD. One pharmacological approach to evaluate possible cognitive effects of compounds includes their ability to reverse scopolamine-induced amnesia. In the current study the succinamide and succinimide of *p*-aminophenol, two newly synthesized compounds that were previously designed to be acetylcholine analogues, were evaluated in a Pavlovian/Instrumental autoshaped memory task. Simultaneously, docking studies on the M1 receptor were done. The scopolamine-induced amnesia was reversed by the amide but not the imide. These findings are in line with results derived from the docking simulations, and suggest that at least the succinamide of *p*-aminophenol could represent a novel candidate for the treatment of AD.

Key Words: Succinic acid, *p*-aminophenol, scopolamine, allosteric, docking simulations, Alzheimer's disease, memory.

1. INTRODUCTION

Replacement of the lost cholinergic function is an attractive proposition for the treatment of Alzheimer's disease (AD), but the cognitive enhancement caused by cholinomimetics developed to date has been compromised by their low bioavailability and strong side effects.

The distribution of muscarinic receptor (mAChR) subtypes in the central nervous system has been investigated mainly by pharmacological studies with relatively good subtype-selective agents well as by molecular, immunohistochemical, immunoprecipitational studies that measure the expression of mRNA levels and receptor protein, and specific methylscopolamine binding in various brain areas of wild-type and mAChR subtypes of knockout mice. According to these reports, the M1 mAChR is abundantly expressed in all forebrain areas including the cerebral cortex and hippocampus, where this subtype consists of 40-50% of the total mAChR [1]. It is known that the M1 subtype in the cerebral cortex and hippocampus may play an important role in higher cognitive processes such as learning and memory [2]. These findings led to the hypothesis that agonists demonstrating selectivity for the M1 subtype could have therapeutic utility for AD by enhancing cognition. Furthermore, M1 agonists, but not cholinesterase inhibitors (CHE-Is), increase the release of soluble amyloid precursor proteins and decrease that of β -amyloid proteins [3, 4]. Thus, selective M1-receptor agonists are expected to be potential cognitive enhancers with much lower incidence of adverse effects than CHE-Is [3,4]. Unfortunately, because of the high conserva-

tion of the agonist binding site across the five subtypes [5], it has been difficult to synthesize compounds that demonstrate M1 subtype selectivity[6].

It is well known that muscarinic receptors contain primary sites (orthosteric sites), where acetylcholine (ACh) agonists and competitive antagonists bind. These receptors have one or more allosteric sites that mediate the effects of various agents on the binding of ligands at the orthosteric site [7]. The binding of the allosteric ligand to the allosteric site alters the affinity with which the muscarinic ligand binds to the primary binding site at the receptor [8]. The cooperative effect of an allosteric agent depends on the particular primary (muscarinic) ligand with which it interacts and may be positive, negative or neutral. If neutral, the allosteric agent binds to the receptor without affecting the affinity of the primary ligand.[9]

Allosteric agents that increase the affinity of the endogenous ligand, known as allosteric enhancers, may have a number of therapeutic advantages compared with agonists that act directly. Such advantages include the possibility of an absolute receptor subtype selectivity (because the allosteric site is the least well conserved region of muscarinic receptors) [7,8], independently of the dose or affinity of the allosteric agent. Even, this latter can show positive cooperativity with the endogenous ligand at only one receptor subtype, but neutral cooperativity with all the others [9, 10]. Thus, it is possible to design compounds that are able to enhance cognition without undesirable side effects.

Previously, two succinic acid derivatives which could be ACh analogues were designed and synthesized [11, 12] Fig. (1). Taking this information into account and considering that M1 mAChR are closely related with higher cognitive function, the capacity of these succinic acid derivatives to reverse the scopolamine-induced amnesia in a Pavlovian/

*Address correspondence to this author at the Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación y Departamento de Bioquímica, Plan de San Luis y Díaz Mirón, México, D.F., 11340 México; E-mail: judith.espinosa@terra.com.mx

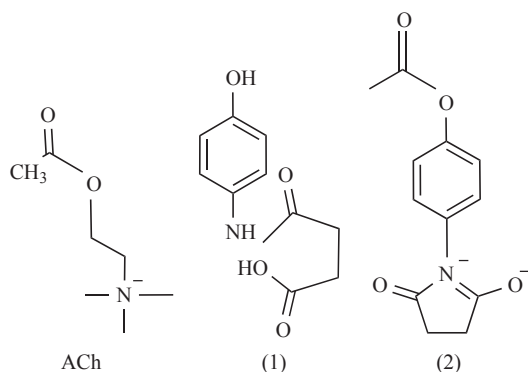


Fig. (1). Chemical structures of the succinic acid derivatives used in this study. ACh: Acetylcholine; (1): *p*-hydroxy-phenylsuccinamide. (2): *p*-acetyl-phenylsuccinimide.

Instrumental autoshaped (P/I-A) memory test was evaluated. Several docking simulations based on Hulme's Homology model, confirmed that these act on M1 mAChR.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Male Wistar rats (200-250 g) were collectively housed in a light-controlled room under a 12:12 h light:dark inverted cycle. Water and food were available *ad libitum*. On the day before the behavioral test, the food was withdrawn. All procedures were conducted following the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999).

2.2. Drugs

Galanthamine (4.5 mg/kg, GAL) and scopolamine (2.0 mg/kg, SCO) were purchased from Sigma Chem. USA. Succinic acid derivatives: *p*-hydroxyl-phenylsuccinamide (1.25, 2.5, 5.0 and 10 mg/kg, (1)) and *p*-acetyl-phenylsuccinimide (10 mg/kg, (2)) were synthesized in our laboratory [11]. GAL and SCO were dissolved in physiological saline, while succinic acid derivatives were emulsified in sesame oil. All compounds were intraperitoneally administered at 1 ml/kg b.w.

2.3. Autoshaping Learning Task

As occurs in Pavlovian autoshaping, conditioned stimulus (CS) and unconditioned stimulus (US) are independent of the behavior of the animal because autoshaped behavior is minimally affected by instrumental responses. Importantly, within the continued progress of behavioral task development, a P/I-A task combines both Pavlovian and instrumental conditioning. The latter offers the opportunity to study hippocampus-mediated declarative memory and striatum-mediated Response-Stimulus "habit formation". Furthermore, P/I-A task is almost completely automated, thus reducing human intervention, and is sensitive to small increases or decreases in various behavioral parameters, including sign tracking and goal tracking. The latter parameter is quite important, as it allows for the study of bidirectional expression of an improved or impaired memory formation. In addition, as in other associative learning tasks, autoshaped

responses are rapidly observed when trials are spaced in time, and its acquisition speed is relatively constant when the CS/US intertrial ratio interval is constant [13].

A Skinner box (WMPC 1999; Med Associates Inc. USA) was used for training. Animals were organized into groups, each of which was given saline, SCO, GAL, (1) (10 mg/kg) or (2) (10 mg/kg). Then, a mixture of SCO with GAL and several doses of each succinic acid derivative were assayed in independent groups. Succinic acid derivatives were administered 45 minutes previous to, while SCO was administered at the end of the first session.

The autoshaping task was as follows: a hungry animal was placed in a Skinner box to find food pellets (US) and was then given a Pavlovian sequential pairing (stimulus-stimulus[S-S]) of light and lever (CS), followed by food (US). After a number of such presentations, the animal approached the CS and presented a conditioned response (CR), such as contact or lever-press. The increase or decrease of the CR was considered an enhancement or impairment of learning, respectively. Each animal was placed in the experimental chamber for a habituation period of 10-15 min with access to 20 food pellets (45 mg each). The three-autoshaping training sessions, one every 24 h, consisted of 20 trials for the first and second sessions, and 10 trials for the third. Final memory results corresponded to the latter [13].

2.4. Molecular Docking on the M1 Muscarinic Receptor

The docking simulations were carried out with the Auto-dock program. The homology model of the M1 mAChR reported by Hulme and co-workers was used [14]. Polar hydrogens were added to the protein, followed by a short energy minimization using the program NAMD and the AMBER force field. Kollman charges and solvation parameters were assigned to the atoms of the protein. [15,16]

ACh, SCO, (1) and (2) were constructed and optimized employing the Hyperchem Program. Each molecule was equipped with Gasteiger charges and the torsion angles were assigned using AUTOTORS. The grid maps representing the protein in the current docking experiments were calculated by using the AUTOGRID utility, included in AUTODOCK. Dimensions of the maps were 100 × 100 × 100 points with a spacing of 0.8 Å, thus being big enough to cover the entire surface of the protein. [15, 16]

For the docking simulations, the hybrid Lamarckian Genetic Algorithm/local search was employed. An initial population of 300 individuals, 50,000,000 energy evaluations, 50,000 generations and 100 independent runs were set for performing the docking experiments. The rest of the parameters remained unmodified. [15, 16]

2.5. Statistical Analysis

Data were analyzed with one way ANOVA and Tukey's *t* test for multiple comparisons. A *p* value of less than 0.05 was considered significant.

3. RESULTS

Fig. (2) shows that the administration of SCO resulted in a pronounced reduction in CRs compared with vehicle-

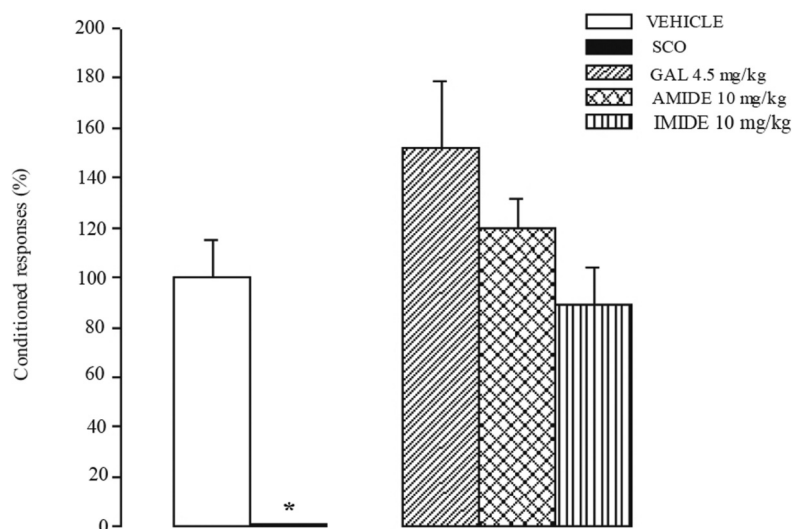


Fig. (2). Effect of all tested drugs on the performance of rats in the autoshaping learning task. Each bar represents the mean \pm SEM of eight animals. SCO (scopolamine), GAL (galanthamine). * $p < 0.001$ vs. all others.

injected animals, $F(4, 32) = 10.96$, $p < 0.001$ (left panel). GAL and the new compounds by themselves did not modify the number of CRs (right panel). Fig. (3) shows that GAL and several doses of (1) reversed the scopolamine-induced amnesia, $F(6, 48) = 15.38$, $p < 0.001$ (right panel). In the same panel, only 2.5 mg/kg of (1) showed a difference compared with the control. Fig. (4) (right panel) only shows the results of 10 mg/kg of (2) because this highest dose did not reverse the SCO effect. Percentages of CRs were as follows: vehicle (100 ± 15.3 , $n = 8$), vehicle + SCO (0.69 ± 0.34 , $n = 8$), vehicle + GAL (151.61 ± 26.92 , $n = 8$), GAL + SCO

(86.4 ± 13.15 , $n = 8$), vehicle + (1) 10 mg (119.6 ± 11.9 , $n = 8$), (1) 10 mg + SCO (143.3 ± 11.2 , $n = 8$), (1) 5 mg + SCO (136.7 ± 11.5 , $n = 8$), (1) 2.5 mg + SCO (163.1 ± 16.4 , $n = 8$), (1) 1.25 mg + SCO (101.5 ± 11.7 , $n = 8$), vehicle + (2) 10 mg (88.8 ± 15.2 , $n = 8$), (2) 10 mg + SCO (2.1 ± 0.9 , $n = 8$).

Docking studies showed that ACh, SCO and (2) docked in the aromatic cage located close to the extracellular domain of the receptor (ΔG_b -4.7, -10.48, and -7.5 kcal/mol, respectively), as previously reported [14]. The aromatic cage is located among the transmembrane domains 3, 5, 6 and 7. (1)

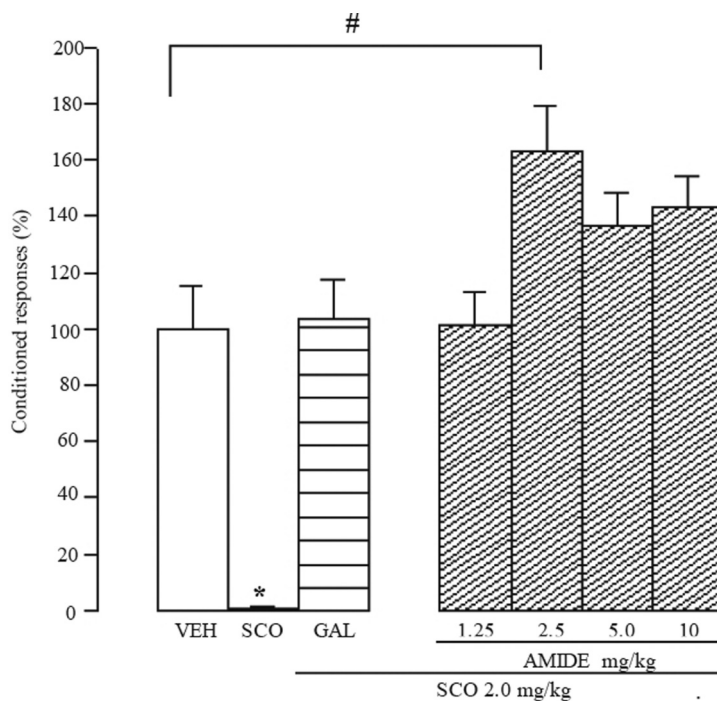


Fig. (3). Reversal of scopolamine-induced amnesia by (1). Each bar represents the mean \pm SEM of eight animals. VEH (vehicle), SCO (scopolamine), GAL (galanthamine). * $p < 0.001$ vs. all others; # $p < 0.05$, SCO + (1) 2.5 mg/kg vs. VEH.

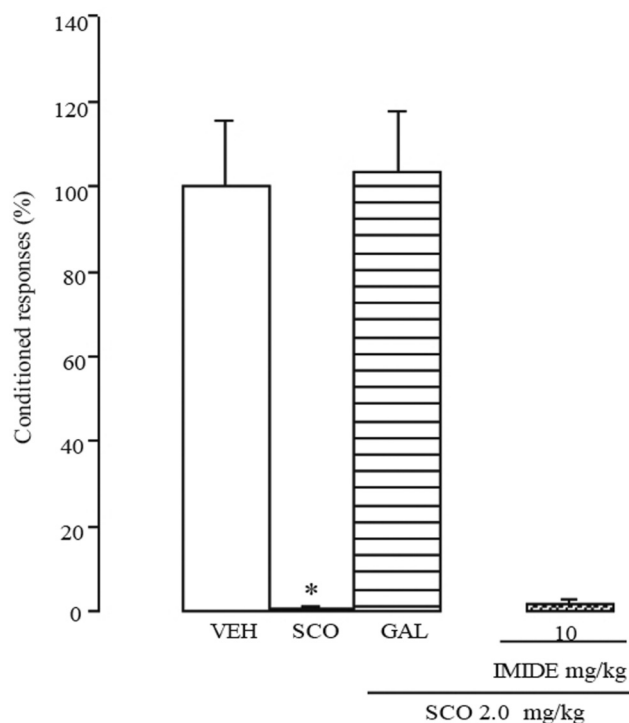


Fig. (4). Reversal of scopolamine-induced amnesia by (2). Each bar represents the mean \pm SEM of eight animals. VEH (vehicle), SCO (scopolamine), GAL (galanthamine). * $p < 0.001$; SCO vs. VEH or SCO + GAL.

preferentially docked in two different sites (Fig. (5)): the ligand binding site ($\Delta G_b - 6.95$ kcal/mol) and another binding site near the intracellular loop 3 and the transmembrane domain 6 between the residues N93, T225, E226, K233, A234, N60, N61, K230, V229, S227, T58, N293, A295 ($\Delta G_b - 7.81$ kcal/mol; based on Hulme's Homology model).

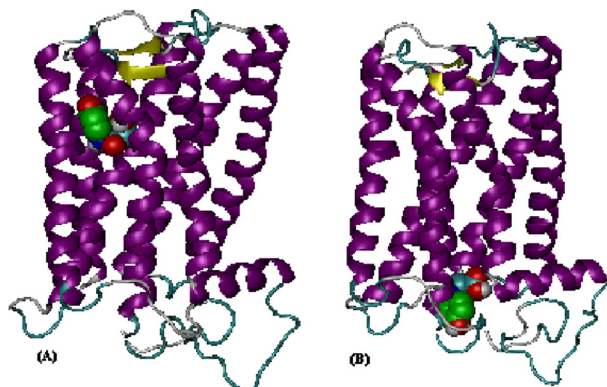


Fig. (5). Representations of the binding mode of (1) on M1 mAChR: (A) Ligand-binding site; (B) Allosteric site.

4. DISCUSSION

The mAChRs are single subunit proteins with seven transmembrane-spanning regions and cytoplasmic domains between the transmembrane segments five and six. Currently, site-directed mutagenesis studies of rat mAChRs suggest that the ACh binding site consists of a series of hydrophobic amino acids located in the "upper" half of transmem-

brane domains III, V, VI and VII. The regions near the transmembrane segments in the second and third internal loops and the N-terminal portion of the third intracellular loop are thought to be involved in the interaction with G proteins. The mAChRs are involved in the control of extrapyramidal locomotor activity and higher cognitive processes, such as learning and memory. The differential distribution of mAChRs subtypes in the brain suggests that the M1 subtype may be particularly important for cognitive processes, since this receptor is rich in forebrain areas such as neostriatum, amygdala, hippocampus, and cerebral cortex, where cholinergic synapses seem to mediate acquisition and storage of new information. [17] As it has been proposed that ACh is involved in memory and learning [17, 18], one pharmacological approach to evaluate possible cognitive effects of compounds includes their ability to reverse the scopolamine-induced amnesia [19, 20, 21, 22]. Lesion studies that employed destruction of the basal forebrain have been used to induce cognitive impairments in animals [20], and it has been found that cholinergic blockage results in acquisition impairment and retrograde amnesia in various animal species regarding different learning tasks [13, 19, 20, 21, 22, 23]. Nowadays, SCO is still used to evaluate the role of the cholinergic system in acquisition, consolidation, and retrieval memories. [13, 21, 22].

Taking into account that P/I-A task requires an intact neuronal system in the hippocampus, septum, and cortex, as well as the participation of the cholinergic signaling transduction pathways in the integration of autoshaping cognitive tasks (acquisition-consolidation process) [24], it was chosen to evaluate the effect of the succinic acid derivatives on scopolamine-induced amnesia. The SCO dose used was chosen based on previous reports showing effects on memory at doses ranging from 0.2-2.0 mg/kg [21, 22, 25, 26]. SCO did not produce motor effects ($t = 0.926$, $p > 0.3$; data not show) and did not interfere with the task because it is administered at the end of the first session. The administration of SCO immediately after the first session resulted in a pronounced reduction in CRs compared with vehicle-injected animals, suggesting impairment of consolidation. Results indicate that (1), but not the (2) derivative, reversed the scopolamine-induced amnesia.

A possible explanation of the action of (1) could be given by the docking studies at M1 mAChR. Recent studies have shown the existence (from docking simulations) of three allosteric sites involved not only in the positive cooperativity with the orthosteric site, but also in the activation of a possible ACh-independent G-protein coupling to the receptor [16, 27]. The existence of an allosteric site located at the intracellular domain of the receptor could play an important role in "allowing" or "stopping" the energy flow along the transmembrane domains and thus could work as an "energy transduction breaker". It has been hypothesized that, in certain cases, the agonist-binding process could be replaced by allosteric activation. In this particular case, G protein-coupling could be agonist-binding independent, *via* the conformational rearrangement of the intracellular face of the receptor [16].

The current study shows that (1) may bind at both the ligand-binding site and the intracellular allosteric site, which might display a complex allosteric mechanism. This process

can be dependent on or independent of the agonist binding to the receptor [16, 27]. Thus, the effect of the **(1)** in the auto-shaping learning task might be due to the dual interaction of the compound at the M1 mAChR. In contrast, **(2)** only behaves as an agonist. In this case, SCO (which displays a better binding free energy) would easily displace **(2)** and therefore would neutralize its agonistic action, a finding consistent with the results of the auto-shaping learning task. Nevertheless, it is important to carry out more experiments to clarify this proposal.

The allosteric ligands of cell-surface receptors might be suitable for most systems where the orthosteric agonism is desired, especially in situations where the enhancement of the endogenous signal is the preferred therapeutic outcome, as occurs in the treatment of degenerative disorders [9, 28, 29]. As already shown for some ligand-gated ion channels, allosteric modulators have several advantages over orthosteric ligands as potential therapeutic agents. Such is the case for GAL, which has dual action at the cholinergic synapses both as CHE-I and as allosteric modulator on the alpha 7 nicotinic receptor [9, 28, 29].

Although in the current study the information regarding the binding of **(1)** on M1 mAChR is only supported by computational docking simulations, this observation suggests that **(1)** could be an allosteric ligand on M1 mAChR. As can be seen in Fig. (5), ligand **(1)** interacts with an allosteric binding on the M1 mAChR. This finding together with previous studies that show that **(1)** [11, 30] is a potent inhibitor on acetylcholinesterase, suggest that at least one of the two succinic acid derivatives could represent a novel candidate for the therapy of AD. However, further experimental evidence designed to confirm these results is required.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to CONACyT, COFAA and SIP-IPN for scholarships and financial support to the authors.

REFERENCES

Received: 31 May, 2006

Revised: 15 August, 2006

Accepted: 16 August, 2006

- [1] Oki, T.; Takagi, Y.; Inagaki, S.; Taketo, M.M.; Manabe, T.; Matsui, M.; Yamada, S. *Mol. Brain Res.*, **2005**, *133*, 6.
- [2] Iwata, N.; Kosuka, M.; Hara, T.; Kaneko, T.; Tonohiro, T.; Sugimoto, M.; Niitsu, Y.; Kondo, Y.; Yamamoto, T.; Sakai, J.; Pagano, M. *Jpn. J. Pharmacol.*, **2000**, *84*, 266.
- [3] Fisher, A.; Brandeis, R.; Bar-Ner, R.H.N.; Kliger-Spatz, M.; Natan, N.; Sonego, H.; Marcovich, I.; Pittel, Z. *J. Mol. Neurosci.*, **2002**, *19*, 145.
- [4] Terry, A.V. Jr.; Buccafusco, J.J. *J.P.E.T.*, **2003**, *306*, 821.
- [5] Hulme, E.C.; Birdsall, N.J.M.; Buckley, N.J. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1990**, *30*, 633.
- [6] Freedman, S.B.; Dawson, G.R.; Iversen, L. L.; Baker, R.; Hargreaves, R.J. *Life Sci.*, **1993**, *52*, 489.
- [7] Birdsall N.J.M.; Lazareno, S.; Matsui, H. *Prog. Brain. Res.*, **1996**, *109*, 147.
- [8] Tuček, S.; Proška, J. *Trends Pharmacol. Sci.*, **1995**, *16*, 205.
- [9] Christopoulos, A. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 198.
- [10] Lazareno, S.; Birdsall, N.J.M. *Mol. Pharmacol.*, **1995**, *48*, 362.
- [11] Trujillo-Ferrara, J.; Vázquez, I.; Espinosa, J.; Santillan, R.; Farfán N.; Höpfl, H. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2003**, *18*, 313.
- [12] Trujillo-Ferrara, J.; Correa-Basurto, J.; Espinosa, J.; Garcia, J.; Martínez, F.; Miranda, N. *Synt. Mol. Comm.*, **2005**, *35*, 2017.
- [13] Meneses, A. *Learn. Mem.*, **2003**, *10*, 363.
- [14] Hulme, E.C.; Lu, Z.L.; Saldanha, J.W.; Bee, M.S. *Biochem. Soc. Trans.*, **2003**, *31*, 29.
- [15] Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A. *J. Comp. Chem.*, **1998**, *19*, 1639.
- [16] Espinoza-Fonseca, M.; Trujillo-Ferrara, J. *FEBS Letters.*, **2005**, *579*, 6726.
- [17] Van der Zee, E.A.; Luiten, P.G.M. *Prog. Neurobiol.*, **1999**, *58*, 409.
- [18] Deutsch, J.A. *Science*, **1971**, *174*, 788.
- [19] Spencer, D.G. Jr.; Lal, H. *Drug Develop. Res.*, **1983**, *3*, 489.
- [20] Olton, D.S. *Brain Res. Bull.*, **1990**, *25*, 499.
- [21] Roldán, G.; Bolaños-Badillo, E.; González-Sánchez, H.; Quirarte, G.L.; Prado-Alcala, R.A. *Neurosci. Letters*, **1997**, *230*, 93.
- [22] Flood, J.F. Cherkin, A. *Behav. Neural Biol.*, **1986**, *45*, 169.
- [23] Decker, M.W.; McGaugh, J.L. *Synapse*, **1991**, *7*, 151.
- [24] Meneses, A.; Hong, E. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **1999**, *71*, 207.
- [25] Chopin, P.; Briley, M. *Psychopharmacology*, **1992**, *106*, 26.
- [26] Chopin, P.; Colpaert, F.C.; Marien, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, *301*, 187.
- [27] Jakubík, J.; Bačáková, L.; Lisá, V.; El-Fakahany, E.E.; Tuček, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1996**, *93*, 8705.
- [28] Albuquerque, E.X.; Santos, M.D.; Alkondon, M.; Pereira, E.F.; Maelicke, A. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **2001**, *15*, S19.
- [29] Geerts, H. *Brain Res. Bull.*, **2005**, *64*, 519.
- [30] Espinosa-Raya, J.; Correa-Basurto, J.; Vázquez-Alcántara, J.I.; Trujillo-Ferrara, J. *Chem. Biol. Interact.*, **2005**, *157*, 379.