Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Toxinas proteicas del veneno de serpientes del género Dendroaspis que reconocen receptores colinérgicos muscarínicos

Kornisiuk, Edgar E.

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Kornisiuk, Edgar E.. (1998). Toxinas proteicas del veneno de serpientes del género Dendroaspis que reconocen receptores colinérgicos muscarínicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3034_Kornisiuk.pdf

Cita tipo Chicago:
Kornisiuk, Edgar E.. "Toxinas proteicas del veneno de serpientes del género Dendroaspis que reconocen receptores colinérgicos muscarínicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3034_Kornisiuk.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis de doctorado:

Toxinas proteicas del veneno de serpientes del género *Dendroaspis* que reconocen receptores colinérgicos muscarínicos

por Edgar E. Kornisiuk

Directora de trabajo y plan de tesis: Dra. Diana A. Jerusalinsky

Desarrollada en el Instituto de Biología Celular & Neurociencias
"Prof. Eduardo De Robertis"
Facultad de Medicina

№ 3034

1998

Título en inglés:

Protein toxins from the venom of *Dendroaspis* snakes that recognize cholinergic muscarinic receptors

Palabras clave: toxinas muscarínicas
receptores colinérgicos muscarínicos
mamba
neurotoxinas
subtipos de receptor muscarínico
neurotransmisión colinérgica
ligandos muscarínicos

Key words: muscarinic toxins
cholinergic muscarinic receptors
mamba
neurotoxins
muscarinic receptor subtypes
cholinergic neurotransmission
muscarinic ligands

Resumen

Toxinas proteicas del veneno de serpientes del género *Dendroaspis* que reconocen receptores colinérgicos muscarínicos.

Hace diez años se reportó la existencia de dos proteínas, MTx1 y MTx2, del veneno de la mamba verde oriental (*Dendroaspis angusticeps*) que inhibieron la unión de ligandos muscarínicos en cerebro de rata. Actualmente se han aislado más de diez toxinas muscarínicas (MTxs) de la mamba verde oriental, la mamba negra (*D. polylepis*) y la mamba verde occidental (*D. viridis*). Estas toxinas poseen 65-66 aminoácidos, con cuatro puentes disulfuro que les confieren una estructura de "tres dedos", tal como las α-neurotoxinas (bloqueantes de receptores nicotínicos), las dendrotoxinas (bloqueantes de canales de K^+) y las fasciculinas (inhibidoras de la acetilcolinesterasa).

Existen cinco subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (m1-m5), aunque sólo pueden discriminarse dificilmente cuatro subtipos farmacológicos (M_1-M_4) por agentes poco selectivos, que no permiten una clasificación confiable y, en consecuencia, una identificación clara.

Nuestros experimentos de unión específica en tejidos nativos permitieron sugerir que ambas toxinas, MTx1 y MTx2, se unen selectivamente al subtipo farmacológico M_1 de receptor muscarínico. Luego demostramos que ambas toxinas presentan alta afinidad y selectividad por los receptores muscarínicos humanos clonados m1 y m4, con muy bajas afinidades relativas por los otros. Estos resultados se confirmaron por experimentos de unión específica en diferentes tejidos centrales y periféricos de rata y conejo; se demostró una unión de alta afinidad en el hipocampo, rico en receptores m1 y m4, y en el estriado, rico en m4, pero no se observó interacción en páncreas, rico en m3, ni en aurícula, rica en m2. El patrón de selectividad de MTx1 fue m1 ≈ m4 >> m5 > m3, m2, siendo MTx1 más potente que MTx2, pero con menor capacidad discriminativa entre m1 y m4.

Tanto MTx1 como MTx2 se comportaron como agonistas muscarínicos, facilitando la consolidación de la memoria cuando se inyectaron en el hipocampo de ratas entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria. En el conducto deferente de conejo las toxinas actuaron como McN-A 343 y CPCP, agonistas relativamente selectivos por el receptor M_1, reduciendo las contracciones fásicas del músculo liso, aunque los efectos de las toxinas no resultaron reversibles. En la misma preparación, las MTxs parecieron tener un efecto sobre los receptores adrenérgicos, que fue reversible. Además, MTx1 y MTx2 resultaron capaces de desplazar la unión de ^{3}H-prazosin, un antagonista α-adrenérgico, a membranas de corteza cerebral y conducto deferente de rata y conejo. La unión de MTx1 y MTx2 a los receptores muscarínicos resultó irreversible, mientras que a los adrenérgicos resultó reversible.

Recientemente hemos aislado dos fracciones proteicas (7000-8000 Da) del veneno de *D. viridis* que parecen ser ligandos potentes y específicos para subtipos de receptores muscarínicos. Una de ellas, DvMT4, mostró selectividad por el subtipo m4, mientras que otra, DvMT3-4, exhibió selectividad por los subtipos m3 y m4.

Dada la carencia de agentes muscarínicos selectivos, estas MTxs resultan muy útiles para localizar y mapear subtipos muscarínicos en el sistema nervioso central, para caracterizarlos y estudiar sus funciones en órgano aislado o *in vivo*.

La familia de las MTxs ha ido creciendo rápidamente y parecen ser ligandos selectivos extremadamente promisorios para el estudio del rol y la distribución de los subtipos de receptores muscarínicos. La comparación de las secuencias permitió definir importantes residuos y regiones de las toxinas, probablemente responsables de su selectividad y acción agonista/antagonista. Esto podría llevar al desarrollo de nuevos ligandos muscarínicos aún más selectivos, tal vez más apropiados como agentes terapéuticos.

Abstract

Protein toxins from the venom of *Dendroaspis* snakes that recognize cholinergic muscarinic receptors.

Ten years ago, two proteins from the venom of the Eastern green mamba snake (*Dendroaspis angusticeps*), MTx1 and MTx2, which inhibited the binding of muscarinic ligands to rat brain, were reported. Actually, more than ten muscarinic toxins (MTxs) have been isolated from Eastern green mamba, black mamba (*D. polylepis*) and Western green mamba (*D. viridis*). All these toxins have 65-66 aminoacids, with four disulphide bonds that confer a "three fingered" structure, shared by α-neurotoxins (nicotinic receptor blockers), dendrotoxins (K^+ channel blockers) and fasciculins (acetylcholinesterase inhibitors).

There are five muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5), although only four pharmacological subtypes (M_1-M_4) are hardly discriminated by poorly selective agents, not enough to enable a reliable classification and a defined identification.

From radioligand binding experiments in native tissues we have suggested that both toxins, MTx1 and MTx2, bound selectively to M_1 pharmacological subtype of muscarinic receptor. Then, we demonstrated that both toxins have high affinity and selectivity for m1 and m4 cloned human muscarinic receptors, with rather low relative affinity for the others. These results were confirmed by binding experiments in different central and peripheral tissues from rat and rabbit. High affinity binding was found in the hippocampus, rich in m1 and m4 receptors, and striatum, rich in m4, but no interaction was found in pancreas, rich in m3, nor in atria, rich in m2. The pattern of selectivity of MTx1 was m1 ≈ m4 >> m5 > m3, m2, being MTx1 more potent than MTx2, but less discriminative between m1 and m4.

Both MTx1 and MTx2 behaved as muscarinic agonists when infused into the hippocampus of rats trained in an inhibitory avoidance task, facilitating memory consolidation. On rabbit vas deferens the toxins acted as the relatively M_1 selective agonists McN-A 343 and CPCP in reducing the twitch response of the smooth muscle, but the effects of toxins were not reversible. In the same preparation, MTxs seemed to have an effect on adrenergic receptors. Then it was shown that MTx1 and MTx2 were able to displace ^{3}H-prazosin binding, an α-adrenergic antagonist, to rat and rabbit cerebral cortex and vas deferens membranes. However, MTx1 and MTx2 binding to muscarinic receptors appear irreversible, while it was reversible to adrenergic receptors.

Recently, we have isolated two protein fractions (7000-8000 Da) from *D. viridis* venom that appear to be potent and specific ligands for subtypes of muscarinic receptors. One of them, DvMT4, showed selectivity for m4 subtype, while the other, DvMT3-4, exhibited selectivities for both m3 and m4 subtypes.

Due to the lack of selective muscarinic agents, MTxs are useful to localise and to map muscarinic receptor subtypes in the central nervous system, to characterise them and to study their functions either in isolated organs or *in vivo*.

The MTx family has been rapidly growing up and they appear as extremely promising selective ligands to study the role and distribution of muscarinic receptor subtypes. The comparison of sequences allowed to define important residues or regions in the toxins, putatively responsible of their selectivity and agonist/antagonist action. This would lead to the development of new more selective muscarinic ligands, that would likely be more appropriate as therapeutic agents.

Uno puede decir con toda tranquilidad que el universo no tiene ningún sentido. Nadie se enfadará. Pero si se afirma lo mismo de un sujeto cualquiera, éste protestará e incluso hará todo lo posible para que quien hizo esa afirmación no quede impune.
Así somos todos: nos exoneramos de toda culpa cuando se trata de un principio general y no nos avergonzamos de quedarnos reducidos a una excepción. Si el universo no tiene ningún sentido, ¿habremos librado a alguien de la maldición de ese castigo?
Todo el secreto de la vida se reduce a esto: no tiene sentido; pero todos y cada uno de nosotros le encontramos uno.

E. M. Cioran

- Agradecimientos
- Abreviaturas

Una pequeña introducción general 1

- Antiguas prácticas y usos nuevos 2
- El sistema nervioso: un mayor nivel de organización 2
- Sobre cómo funciona el sistema nervioso: Sinapsis químicas, neurotransmisores y receptores 3
- La acetilcolina como neurotransmisor 6
- Los receptores colinérgicos 8
- Nomenclatura del receptor muscarínico 10
- El camino en búsqueda de la estructura del receptor 12
- Distribución de los receptores 14
- Algunos sitios de acción de la acetilcolina en vertebrados y sus rasgos funcionales 15
- Sistemas colinérgicos cerebrales en mamíferos 16
- Farmacología de los receptores muscarínicos: otro problema inconcluso 17
- Acerca de cómo se reconocen los fármacos y receptores 21
- Ligandos muscarínicos más utilizados 23
- Ofidios, o los fabricantes de toxinas 29
- Toxinas que actúan sobre el receptor muscarínico 33

Materiales y métodos 37

- Aislamiento y purificación de las toxinas muscarínicas 38
  - Determinación de aminoácidos 40
- Preparación de membranas para los ensayos de fijación específica 41
  - Preparación de membranas sinaptosomales de corteza cerebral, tallo cerebral, hipocampo y estriado 41
  - Preparación de membranas de conducto deferente 42
  - Preparación de membranas de páncreas 43
- Determinación de proteínas 43
- Receptores muscarínicos clonados 44
- Ensayos de fijación específica 45

- Experimentos de inhibición 45
- Experimentos de saturación 46
- Experimentos de asociación 46
- Experimentos de disociación 47
- Radioligandos 47
- Condiciones de ensayo 48
- Radioiodinación de MTx2 y experimentos de fijación específica 49
- Experimentos de fijación específica de radioligandos a cortes de cerebro de rata 50
  - ❖ Obtención de autorradiogramas de la fijación de radioligandos muscarínicos 51
  - ❖ Cuantificación de la fijación específica de radioligando en autorradiogramas 52
- Análisis de los resultados de fijación específica 52
  - A) Cálculos 52
  - B) Ajuste de curvas 53
    - ❖ Curvas de saturación 53
    - ❖ Curvas de inhibición 54
    - ❖ Curvas de asociación 55
    - ❖ Curvas de disociación 55
    - ❖ Comparación de los ajustes a dos ecuaciones 55
- Experimentos fisiológicos 57
  - Experimentos de captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas 57
  - Entrenamiento de evitación inhibitoria 58
  - Íleo de cobayo 60
  - Aurícula de cobayo 60
  - Conducto deferente de conejo 61
  - Conducto deferente de rata 61

Resultados 62

Capítulo I - Aislamiento y purificación de las toxinas 63
- Aislamiento y purificación de MTx1 y MTx2 65
- Composición de aminoácidos y secuencia N-terminal 69
- Discusión del capítulo I 71

Capítulo II - Ensayos de fijación específica en receptores nativos 78

- Experimentos en equilibrio 80
  - Ensayos de fijación específica de radioligandos en corteza y tallo cerebrales 80
    - ❖ Experimentos de inhibición 80
    - ❖ Experimentos de saturación 88
  - Ensayos de fijación específica de radioligandos en membranas de hipocampo 91
    - ❖ Experimentos de inhibición 91
  - Ensayos de fijación específica de radioligandos en membranas de estriado 92
    - ❖ Experimentos de inhibición 92
  - Ensayos de fijación específica de radioligandos en membranas de páncreas 94
    - ❖ Experimentos de inhibición 94
  - Ensayos de fijación específica de radioligandos en membranas de conducto deferente de rata y conejo 95
    - ❖ Experimentos de inhibición 95
  - Ensayos de fijación específica con ^{125}I-MTx2 99
    - ❖ Experimentos de saturación 99
- Experimentos cinéticos 101
  - Disociación del radioligando muscarínico ^{3}H-PZ en presencia de MTx2 101
  - Evaluación de la reversibilidad de la unión de las toxinas 103
    - ❖ Experimentos de asociación 103
- Discusión del capítulo II 106

Capítulo III - Ensayos de fijación específica en receptores colinérgicos muscarínicos clonados 116

- Experimentos en equilibrio 118
  - Ensayos de fijación específica en receptores m1 y m2 expresados en células Sf9 e incorporados en membranas artificiales 118
    - ❖ Experimentos de inhibición 118
    - ❖ Experimentos de saturación 121
  - Ensayos de fijación específica en receptores clonados m1, m2, m3, m4 y m5, expresados en membranas de células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus 123
    - ❖ Experimentos de inhibición 123
    - ❖ Experimentos de saturación 125
- Experimentos cinéticos 128

- Evaluación de la reversibilidad de la unión de las toxinas 128
  - ❖ Curvas de asociación 128
- Discusión del capítulo III 131

Capítulo IV - Experimentos fisiológicos 135
- Experimentos de captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas 136
  - Antecedentes y objetivos 136
  - Ensayos de estimulación por alto potasio 137
  - Ensayos con ligandos clásicos de los receptores muscarínicos 138
  - Ensayos con las toxinas muscarínicas 140
- Ensayos en aurícula de cobayo 141
- Ensayos en íleo de cobayo 142
- Ensayos en conducto deferente de conejo 143
  - Antecedentes y objetivos 143
  - Experimentos con las toxinas muscarínicas 144
- Conducto deferente de rata 150
- Efecto de las toxinas muscarínicas MTx1 y MTx2 sobre la consolidación de una memoria de evitación inhibitoria en ratas 151
- Discusión del capítulo IV 155

Capítulo V - Ensayos de fijación específica en cortes de cerebro de rata 166
- Ensayos de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS en cortes de cerebro de ratas 167
- Discusión del capítulo V 175

Capítulo VI - Otras toxinas muscarínicas 179
- Cromatogramas 182
- Experimentos de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS 186
- Discusión del capítulo VI 191

Discusión general y conclusiones 194
- Toxinas fabricadas por ciertos ofidios, vistas luego de este trabajo 195
- Toxinas muscarínicas selectivas 197
- Consideraciones acerca de la estructura de las toxinas 199

- Sobre el posible sitio de unión de las toxinas 203
- Sobre la nomenclatura de las toxinas muscarínicas 207
- Algunas perspectivas sobre la posible utilidad de las toxinas muscarínicas 208
- Conclusiones 210

Bibliografía 212

Agradecimientos

La ciencia es una actividad humana que, en general, no se realiza en soledad, y el presente trabajo no se aleja de esta norma. Me resulta grato decir que me encuentro en deuda con las siguientes personas:

Mi directora de tesis, Dra. Diana Jerusalinsky, quien hace ya varios años depositó en mí su confianza y siempre me apoyó en este quehacer, en los buenos y también en los malos momentos.
Mis compañeros de laboratorio: Lina, Claudia, Haydeé, Magalí, Paula, Mariana, Lía, Jorge, Daniel, Rudy, Martín, Gustavo, Claudinho, Emiliano, quienes me han ayudado y acompañado muchas veces, y de los que aprendí tantas cosas.
El Dr. Carlos Cerveñansky y Rosario Durán, del IIBCE de Montevideo, quienes realizaron el aislamiento y purificación de las toxinas.
El Dr. Alan Harvey y su grupo, quienes realizaron los experimentos fisiológicos en conducto deferente.
El Dr. Jorge Medina, por su lectura crítica de este trabajo.

Mis padres, Chichí y Pedro, gracias a quienes es posible que en este momento me encuentre escribiendo estas líneas.
Mercedes ha sido el motor que me mantuvo en funcionamiento todos estos años, y a la vez hizo más rica y compleja mi vida.
A ellos les dedico este epílogo.

Además, a nivel institucional, me apoyaron los siguientes organismos:
El CONICET, organismo que me otorgó las becas que me permitieron poder vivir mientras tanto.
La Fundación Antorchas, que me apoyó en un momento complicado, ayuda sin la cual no podría haber concluído el presente trabajo.
International Foundation for Science, por haberme apoyado con un subsidio para investigadores jóvenes, en el proyecto de las toxinas muscarínicas.
El Instituto de Biología Celular & Neurociencias, donde se realizaron la mayoría de los experimentos mostrados aquí.

Abreviaturas utilizadas

ACh: acetilcolina
AF-DX 116: 11-([2-{(dietilamino) metil}-1-piperidinil] acetil)-5,11-dihidro-6H-pirido [2,3-*b*] [1,4] benzodiazepina-6-ona
AF-DX 384: 5,11-dihidro-11-{[(2-[2-{(dipropilamino) metil]-1-piperidinil} etil) amino] carbonil}-6H-pirido [2,3-*b*] (1,4) -benzodiazepina-6-ona
AmOAc: acetato de amonio
B_{max}: número máximo de sitios aceptores unidos específicamente al radioligando
BSA: seroalbúmina bovina
CPCP: 4-[N-(4-clorofenil)carbamiloxi]-4-pent-2-ynyl-trimetilamonio iodide
4-DAMP: 4-difenil acetoxi-N-metil piperidina metiodide
DPX: 1,3-dietil-8-fenilxantina
^{3}H: tritio
HPLC: cromatografía líquida de alta presión
^{125}I: isótopo radioactivo del iodo
K_D: constante de disociación aparente (de equilibrio)
K_i: constante de inhibición aparente (de equilibrio)
M_1-M_4: subtipos de receptores muscarínicos, definidos sobre bases farmacológicas o funcionales
m1-m5: subtipos de receptores muscarínicos, definidos sobre la base de las secuencias de ARNm
McN-A 343: cloruro de 4-(*m*-clorofenil carbamil oxi)-2-butinil trimetil amonio
MTx: toxina muscarínica
NMDA: N-metil-D-aspartato
NMS: *N*-metil escopolamina
PBCM: mostaza de propilbenzililcolina - N-(2-cloroetil) N-propil-2-aminoetilbenzilato
***p*-F-HHSiD:** *para*-fluoro-hexahidrosiladifenidol
PRZ: prazosin
PZ: pirenzepina
QNB: benzilato de quinuclidina

Una pequeña

Introducción General

Antiguas prácticas y usos nuevos

Las diversas culturas humanas tuvieron entre sus actividades cotidianas la búsqueda y el uso de sustancias naturales para consumo de uso terapéutico, ritual, o simplemente en la búsqueda de placer. Estos conocimientos fueron adquiridos a través del desarrollo cultural, en la exploración del medio ambiente, con base empírica y conservados por tradición. Son innumerables los ejemplos de productos, tanto de origen vegetal como animal, utilizados desde hace mucho tiempo con estas finalidades. Tal es el caso de extractos vegetales usados para aliviar o curar dolencias físicas, o de venenos animales, en la construcción de armas de caza, por ejemplo.

La ciencia occidental, en el último siglo, en cierta forma ha sistematizado más recientemente la búsqueda de estos principios existentes en la naturaleza y ha desarrollado técnicas de síntesis de nuevas sustancias semejantes a las encontradas, con el propósito de optimizar su utilidad.

Dentro del reino animal, los venenos en los distintos grupos taxonómicos han sido enfocados por el interés de los investigadores. Dentro de los vertebrados, quizás sean los ofidios los que más variedad presentan de sustancias con acciones sobre los mecanismos fisiológicos de mamíferos, y más interesantemente, de humanos.

El sistema nervioso: un mayor nivel de organización

Los organismos vivientes se caracterizan, entre otras cosas, por su capacidad homeostática, fundamental para la conservación de su estructura-función —autopoiesis, ver Maturana y Varela, 1984—. Durante la filogenia, uno de los saltos cualitativos más importantes en esta dirección fue la aparición de células y tejidos excitables,

particularmente la aparición de neuronas y sistemas nerviosos, los cuales tienen por función, según la metáfora representacionista dominante actualmente (ver Maturana y Varela, 1984), captar información, tanto del medio ambiente como del medio interno del organismo, conducirla a centros de análisis e integración de muy variada complejidad, pudiendo, una vez procesada dicha información, dar una respuesta a tal diferencia percibida por vía de distintos sistemas efectores. La presencia de sistemas nerviosos en la mayoría de los grupos animales muestra que fue una adquisición evolutiva relativamente temprana en la filogenia.

Sobre cómo funciona el sistema nervioso: Sinapsis químicas, neurotransmisores y receptores

Las funciones y los funcionamientos del sistema nervioso son posibles gracias a la capacidad de las neuronas que lo componen de recibir, conducir y transmitir las perturbaciones que aquél maneja. Estas "señales" transportadas por las neuronas se codifican básicamente en forma eléctrica y química. Los cambios eléctricos consisten en variaciones temporarias en el potencial eléctrico entre las caras externa e interna de la membrana plasmática, y esto se debe a modificaciones transitorias de la permeabilidad de la misma a uno o más iones, pudiendo estas perturbaciones ser conducidas a lo largo de la membrana de la célula nerviosa. Al llegar a la porción terminal de una neurona (por ejemplo, el terminal axónico) la perturbación puede ser transmitida a otra neurona eléctricamente por vía de un contacto estrecho entre las membranas plasmáticas (uniones "gap"), en las sinapsis eléctricas, o por la liberación de un neurotransmisor, en la sinapsis química, que son las que nos ocuparán aquí. Una vez liberado el neurotransmisor, atraviesa el espacio sináptico y se une a receptores

específicos ubicados en la membrana post-sináptica, los que, al activarse, producen modificaciones eléctricas o químicas en la neurona blanco.

La codificación química de los mensajes puede originar una señal hacia el interior celular, en forma de acople a segundos mensajeros, o bien hacia otra neurona, en forma de neurotransmisor, en las sinapsis. Esta estructura-proceso llamada sinapsis es la base de la comunicación interneuronal.

En la década del veinte, Otto Loëwi (Loëwi, 1921) realizó unas experiencias que mostraron por vez primera la naturaleza química de la transmisión sináptica (sinapsis química), aunque también existen sinapsis de tipo eléctrico.

El modelo clásico de la sinapsis química enuncia que el potencial de acción provoca una depolarización temporaria de la membrana presináptica (que en el estado estacionario se encuentra polarizada), y que permite la ocurrencia de una serie de eventos que producen la liberación con modalidad cuántica de moléculas neurotransmisoras al espacio sináptico, para unirse luego a receptores específicos ubicados en la membrana postsináptica. La activación de estos receptores inicia una secuencia de carácter bioquímico y biofísico que resultará en cambios en la neurona postsináptica. Este patrón secuencial de eventos se reproduce, a grandes rasgos, en las distintas regiones del sistema nervioso de un organismo (central o periférico) e incluso se ha conservado en la historia filogenética.

El sistema nervioso se encuentra involucrado en las más variadas funciones de los organismos. Este sistema es capaz de coordinar e integrar los procesos vegetativos, detectar estímulos ambientales, efectuar respuestas motoras y realizar procesos más complejos como son el aprendizaje, la memoria y otros fenómenos cognitivos. Un requisito necesario para poseer estas capacidades es su complejidad.

Una de las facetas más estudiadas del sistema nervioso es la transmisión sináptica. Este es un proceso clave en la comunicación interneuronal, y las técnicas y metodologías desarrolladas desde hace algunas décadas la hicieron posible objeto de estudio. De hecho, la gran mayoría de los fármacos neuroactivos utilizados en la terapéutica actúan a nivel de las sinapsis.

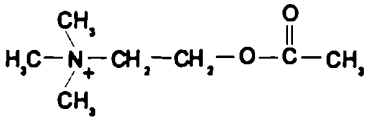
Existen criterios clásicos que son utilizados para definir a una sustancia como neurotransmisor (De Robertis y De Robertis, 1988), y que constituyen una piedra fundamental en la neuroquímica:

- Debe encontrarse en el terminal nervioso.
- Debe ser liberado por estimulación nerviosa.
- Sus efectos deben parecerse a los producidos por estimulación nerviosa.
- En ensayos *in vitro*, sus efectos deben ser modificados por drogas específicas (agonistas y antagonistas) en el mismo sentido y con magnitud similar que en la situación *in vivo*.
- Debe ser inactivada después de su acción en la transmisión sináptica.

Los neurotransmisores se liberan de las vesículas sinápticas que se encuentran en la presinapsis y ejercen su acción sobre la membrana celular de la neurona postsináptica y, a veces, también sobre la presináptica, interactuando con macromoléculas proteicas específicas para el reconocimiento de dicho neurotransmisor, los receptores sinápticos. Estos receptores se encuentran acoplados a algún sistema de transducción celular, como son los sistemas de segundos mensajeros químicos —receptores metabotrópicos—, o bien pueden constituir ellos mismos un canal iónico y producir cambios eléctricos por flujo de iones a través de la membrana neuronal —receptores ionotrópicos—.

Se denominan agonistas a las drogas que provocan una respuesta similar a la del neurotransmisor endógeno, mientras que a las que previenen la acción de los agonistas se las llama antagonistas; dichas drogas generalmente tienen su sitio de acción en los receptores específicos. Mediante estudios farmacológicos, utilizando las particularidades de dichas drogas, es posible caracterizar a los receptores en cuanto a su localización, función y rasgos estructurales.

La acetilcolina como neurotransmisor



ACETILCOLINA

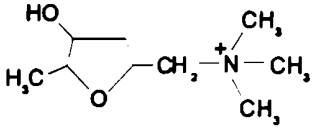
Lo más curioso de la acetilcolina es que hizo su aparición en la historia evolutiva mucho tiempo antes de que lo hicieran los sistemas nerviosos y, por supuesto, las sinapsis funcionales. Se encuentra en taxones muy diversos, en los vertebrados, pero también en bacterias, hongos y protozoos, los que llevan un muy largo período de divergencia evolutiva. También se encuentra en los vegetales, que carecen de sistemas nerviosos en su diseño. Estos organismos cuentan con la capacidad de almacenarla, así como con la maquinaria para su biosíntesis y degradación.

En los vertebrados la distribución de la acetilcolina excede los límites del sistema nervioso (se encuentra, por ejemplo, en la córnea, en algunos epitelios ciliados, en el bazo de los ungulados, en la placenta humana, etc.), pero sus acciones y funciones más importantes y conspicuas residen en las células nerviosas y musculares (ver Weiner y Taylor, 1985).

Ubicándonos en un contexto histórico, podemos decir que ya en 1914 Henry Dale identificó a la acetilcolina como un posible mediador de ciertas funciones fisiológicas, imitando los efectos de la estimulación del nervio vago del corazón de la rana (Dale,

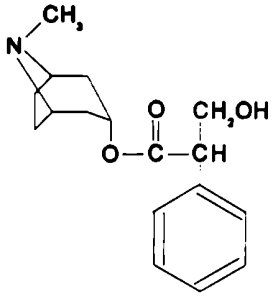
1914). Posteriormente, en la década del veinte, Otto Loëwi evidenció su liberación por la estimulación del mismo nervio (Loëwi, 1921). La acetilcolina se convirtió de esta forma en el primer neurotransmisor en ser identificado.

Durante décadas se supo que los receptores colinérgicos pueden dividirse en dos tipos principales, sobre la base de sus propiedades farmacológicas (Dale, 1914; para una revisión más reciente ver Burgen, 1995). Los receptores sensibles a la toxina de la planta de tabaco, llamada nicotina, fueron denominados nicotínicos; mientras los sensibles a la toxina muscarina, del hongo venenoso *Amanita muscaria*, se llamaron muscarínicos. Esta clasificación empírico-farmacológica resultó sorprendentemente adecuada, al validarse luego por los estudios estructurales, morfológicos y bioquímicos, y más recientemente, a nivel molecular.



MUSCARINA

En este contexto, pudieron dilucidarse los modos de acción farmacológica de ciertas drogas ya conocidas desde la antigüedad, como la atropina y el curare, resultando ser antagonistas selectivos para cada uno de los dos tipos de receptores: muscarínicos y nicotínicos, respectivamente (Weiner y Taylor, 1985).



ATROPINA

Se encuentra entre los vegetales una gran cantidad de sustancias neuroactivas. La familia de las solanáceas, en particular, posee especies con alto contenido de alcaloides naturales de bajo peso molecular que actúan sobre el receptor muscarínico, como son la atropina (de *Atropa belladona*), pilocarpina (de *Pilocarpus jaborandi*), escopolamina (de *Scopolia carniolica*), hiosciamina (de *Hyoscyamus niger*). Este es un ejemplo claro del modo en que algunas biomoléculas, particularmente toxinas naturales, pueden ser de utilidad en el estudio de los componentes y sus funcionamientos en el sistema nervioso.

Los receptores colinérgicos

Los receptores nicotínicos pertenecen a la superfamilia de receptores ionotrópicos, esto es canales iónicos activados por ligando. Dichos receptores consisten en subunidades proteicas que se ensamblan entre sí, atravesando la bicapa lipídica de la membrana plasmática, formando un canal hidrofílico que puede comunicar los medios acuosos extra e intracelular. En el caso del receptor nicotínico, cationes como el Na^+ y el K^+ pueden fluir a través de dicho canal cuando la acetilcolina interacciona con sitios ubicados en el lado extracelular del receptor. Luego de la disociación de la acetilcolina del receptor, el canal iónico se cierra, de manera que en el estado de reposo no existe movimiento de iones a través del receptor (Changeux y col., 1984).

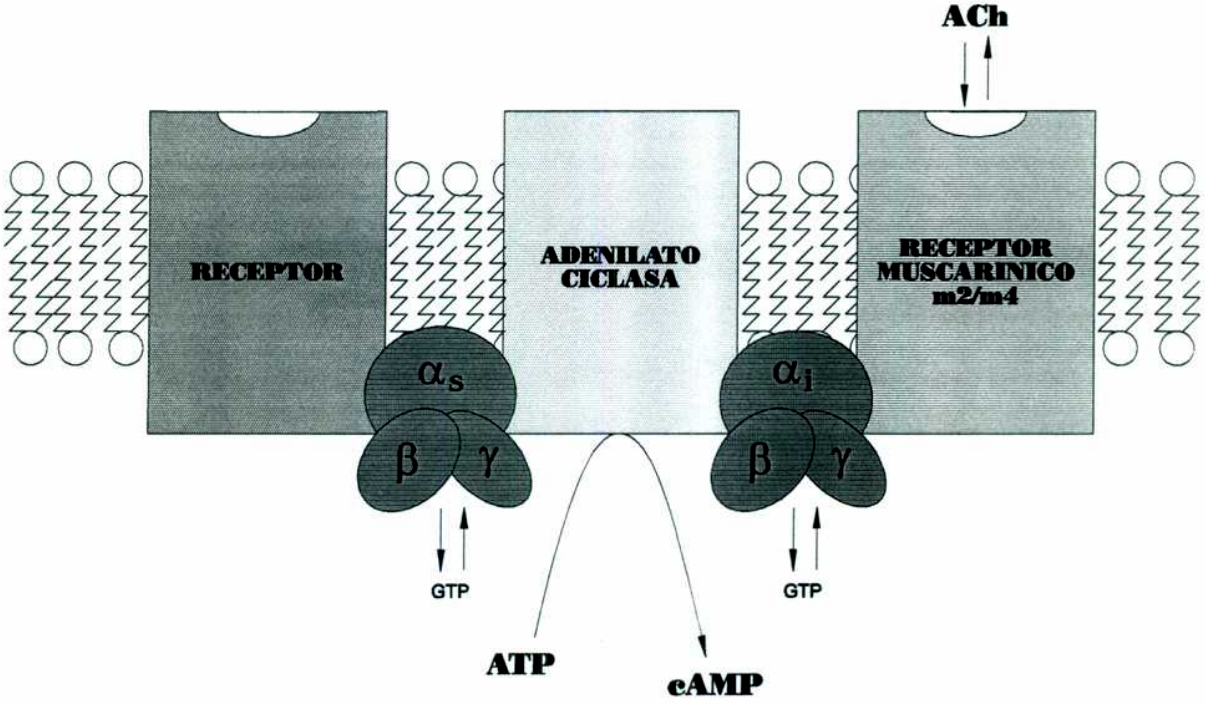


Figura Intro-1
Esquema que representa el mecanismo preferencial de acoplamiento de los subtipos m2 y m4 de receptor muscarínico, a través de proteínas G inhibitorias de la adenilato ciclasa. El efecto se hace evidente cuando esta enzima se encuentra activada por acción de otro receptor.

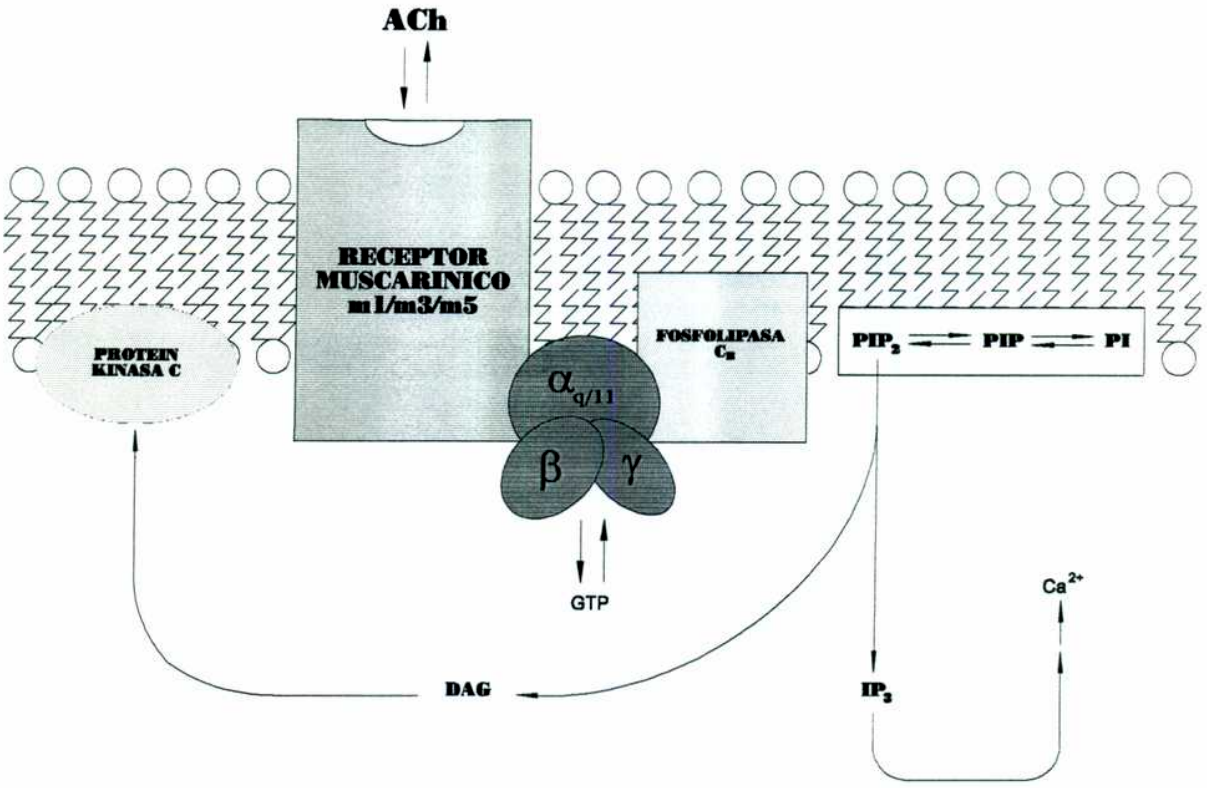


Figura Intro-2
Esquema que representa el mecanismo preferencial de acoplamiento de los subtipos m1, m3 y m5 de receptor muscarínico, a través de proteínas G estimulatorias de la fosfolipasa C. La activación de esta enzima desencadena la cascada de metabolismo de fosfoinosítidos, diacilglicerol, proteína quinasa C y aumento de Ca^{2+} intracelular.

Los receptores muscarínicos pertenecen a los de tipo metabotrópico. Estos receptores no contienen en su estructura un canal iónico, pero transducen la señal hacia el interior celular a través de interacciones con proteínas de membrana que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) (Nathanson, 1987). Éstas, a su vez, interactúan con enzimas como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C o con canales iónicos, por ejemplo de K^+. Por acción de la acetilcolina sobre el receptor muscarínico se alteran los niveles intracelulares de segundos mensajeros químicos, como el AMPc, GMPc y fosfatos de inositol, fenómeno que involucra a las proteínas G (ver Figuras Intro-1,

Intro-2 e Intro-3). Como evento posterior, pueden alterarse conductancias a iones como K^+ y Ca^{2+}, como resultado de cascadas de procesos bioquímicos (ver Skok y col., 1989).

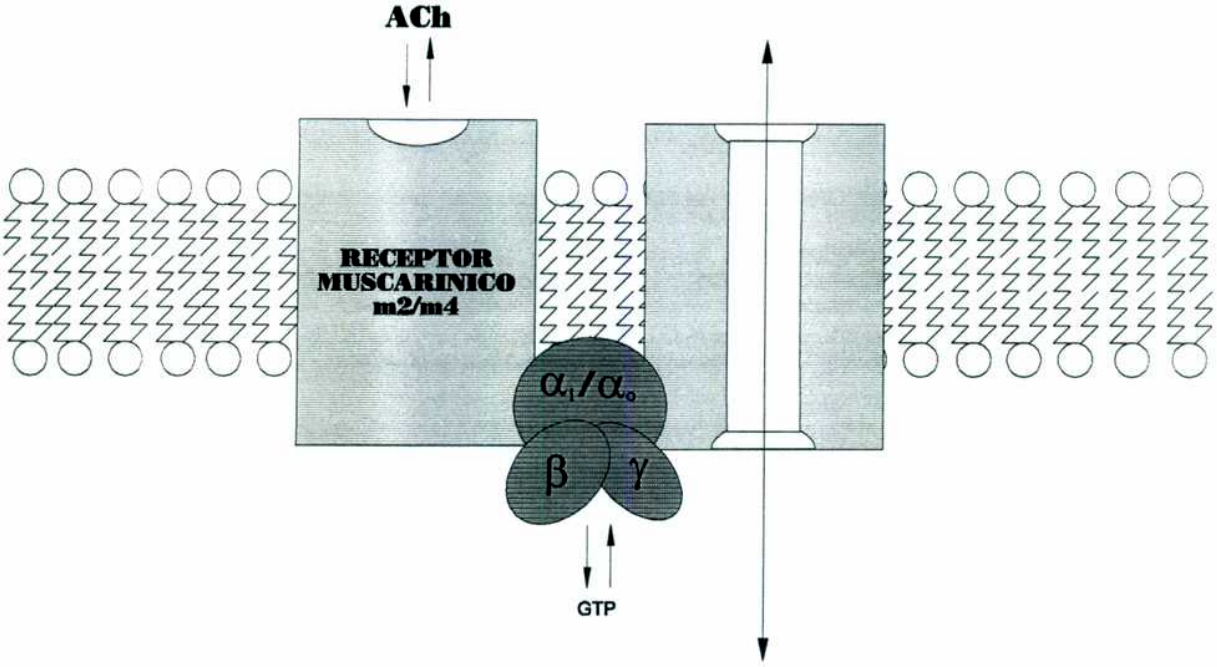


Figura Intro-3
Esquema que representa un mecanismo propuesto de acoplamiento de los subtipos m2 y m4 de receptor muscarínico, a través de proteínas G que regularían directamente canales catiónicos.

Nomenclatura del receptor muscarínico

Resulta conveniente aclarar algunos aspectos en cuanto a la nomenclatura utilizada comúnmente para los subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos, según sea la discriminación farmacológica o génica (estructura primaria). Si se definen los subtipos en cuanto a su perfil farmacológico (estudios de fijación específica y funcionales en sistemas nativos), hablamos de receptores M_1, M_2, M_3; si se lo hace

desde un punto de vista de su estructura primaria (secuencia de aminoácidos), hablamos de receptores m1, m2, m3, m4 y m5 (Birdsall, 1989; Hosey, 1992). Se puede hacer una correspondencia parcial entre tales nomenclaturas (Tabla Intro-A) (ver Hulme y col., 1990; Kenakin y col., 1992; Eglen y Watson, 1996).

TABLA Intro-A
Nomenclatura y farmacología de los subtipos de receptor muscarínico

Subtipo Farmacológico	M_1	M_2	M_3	*M_4?	—
Nombres previos	$M_{1\alpha}$	$M_{2\alpha}$ M_2 cardíaco	$M_{2\beta}$ M_2 glandular	—	—
Secuencia	m1	m2	m3	m4	m5
Nº Aminoácidos (humanos)	460	466	590	478	531
Efector (proteína G)	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$
Radioligandos	^{3}H-pirenzepina	^{3}H-AF-DX 384	—	—	—
Antagonistas selectivos	pirenzepina telenzepina	methoctramina AF-DX 116 gallamina (no comp.) himbacina	hexahidrofluoro-siladifenidol β-fluorosila-difenidol	tropicamida	—

*El subtipo farmacológico M_4 aún no ha sido claramente caracterizado.

El camino en búsqueda de la estructura del receptor

En la década del '70 aún no era imaginada la estrecha relación existente entre proteínas tales como el receptor β-adrenérgico, la rodopsina y el receptor muscarínico. Con el desarrollo de técnicas que posibilitaron el estudio de la estructura, secuenciación y, posteriormente, el clonado de proteínas, se evidenció dicha relación. Estas moléculas, proteínas integrales de membranas biológicas, comparten características comunes con la superfamilia de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Están formadas por una sola cadena polipeptídica, con siete segmentos hidrofóbicos con configuración α-hélice, que, se propuso, corresponden a porciones transmembrana, unidos por tres segmentos extracelulares y tres intracelulares. Todas estas proteínas poseen una estructura terciaria muy similar y un cierto grado de homología; así, la bacteriorrodopsina sirvió en un principio como modelo para el estudio de dicha estructura y para la comprensión de los mecanismos de acoplamiento (Hall, 1987; Hulme y col., 1991). Como se observa en la Figura Intro-4, esta familia posee siete segmentos transmembranales (TM1-TM7), tres segmentos intracitoplasmáticos (I1-I3) y tres extracelulares (E1-E3), con el extremo C-terminal intracelular y el N-terminal extracelular.

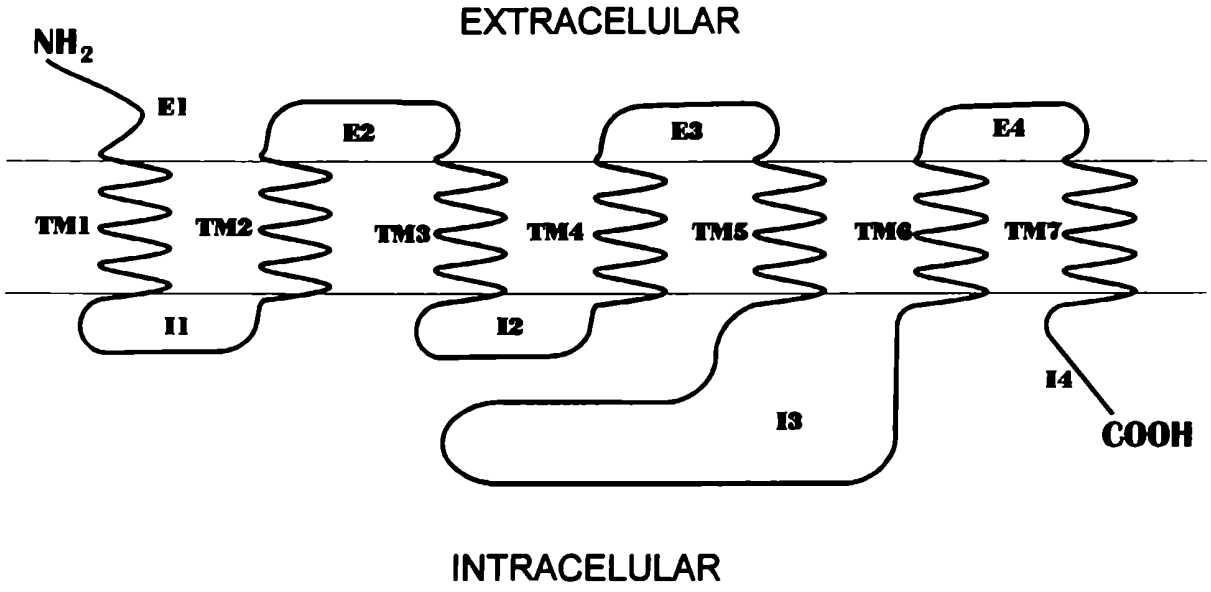


Figura Intro-4
Esquema que representa la estructura general de los receptores muscarínicos, coincidente con la de varios receptores metabotrópicos, con siete segementos transmembranales (TM1-TM7), cuatro extracelulares (E1-E4) y cuatro intracelulares (I1-I4).

Desde 1986 comenzaron a clonarse los receptores muscarínicos; los primeros fueron el cerebral y el cardíaco porcinos (m1 y m2 respectivamente), utilizando una estrategia de búsqueda con sondas de oligonucleótidos en bibliotecas de cDNA (Kubo y col., 1986a,b). Un año más tarde fueron identificados dos clones más, con una estrategia similar (receptores m3 y m4) (Bonner y col., 1987). Posteriormente, y junto al hallazgo de un quinto gen (m5), se clonaron la mayoría de los receptores muscarínicos de rata, porcino, ratón y humano (Bonner, 1989; Hulme y col., 1990, 1991). Como dato evolutivo interesante se puede mencionar la identificación y clonado, en los últimos años, de receptores muscarínicos también en insectos como *Drosophila* (ver Trimmer, 1995; Osborne, 1996), evidencia de su antigüedad filogenética.

Distribución de los receptores

En cuanto a la distribución predominante que presentan tales subtipos, se realizaron determinaciones con técnicas de "northern blot" con los siguientes resultados (Hulme y col., 1990):

- m1 y m3: cerebro y glándulas exócrinas;
- m2: corazón y músculo liso;
- m4: distribución discreta en tejido neural;
- m5: no detectado.

Análogamente, utilizando hibridación *in situ* para discriminar la distribución regional en secciones de cerebro de rata (Hulme y col., 1990) se observó:

- m1: localización telencefálica, particularmente abundante en corteza cerebral, estriado e hipocampo;
- m2: encontrado en pequeñas cantidades en el septum medial, protuberancia y tálamo;
- m3: al igual que m1, se encuentra predominantemente en el cerebro anterior, y además en núcleos talámicos y del tallo cerebral;
- m4: en corteza cerebral, estriado e hipocampo;
- m5: hallado en muy bajos niveles en hipocampo y en algunos núcleos del tallo cerebral.

Algunos sitios de acción de la acetilcolina en vertebrados y sus rasgos funcionales

En vertebrados, los rasgos específicos de la transmisión colinérgica varían marcadamente en sitios diferentes. Básicamente, los sitios de acción de la acetilcolina son:

1. Placas motoras del músculo esquelético inervadas por nervios motores somáticos. La acetilcolina es liberada y se une a receptores nicotínicos presentes en las placas de las fibras musculares, produciendo contracción muscular.
2. Sitios efectores del sistema nervioso autónomo, inervados por fibras parasimpáticas post-ganglionares, que son músculo liso o bien, el sistema de conducción cardíaca (nódulo sino-auricular, aurícula, nódulo aurículo-ventricular y sistema de His-Purkinje). Principalmente mediadas por receptores muscarínicos, las acciones de la acetilcolina consisten en modificar las actividades intrínsecas eléctrica y mecánica del músculo liso, pero no iniciarlas.
3. Células ganglionares simpáticas y parasimpáticas y médula adrenal, inervadas por fibras preganglionares del sistema nervioso autónomo. La función puede ser tanto muscarínica como nicotínica, así como excitadora o inhibitoria.
4. Ciertas sinapsis dentro del sistema nervioso central. El sistema colinérgico del cerebro anterior se origina en las células del núcleo basal de Meynert o núcleo basal magnocelular (dependiendo de la especie), que proyecta a toda la corteza cerebral. Los ganglios de la base y las estructuras del sistema límbico presentan sinapsis colinérgicas involucradas en funciones superiores del sistema nervioso central. La neurotransmisión colinérgica central es predominantemente muscarínica, pero puede ser en algunos casos nicotínica, con características distintas de la periférica.

Las neuronas colinérgicas presentan una distribución rostro-caudal, principalmente en la base del encéfalo. La formación reticular medial romboencefálica contiene elementos colinérgicos, así como el área tegmental lateral del romboencéfalo rostral (ver Nieuwenhuys, 1985), pero las agrupaciones de somas neuronales más importantes se encuentran en la base del cerebro anterior. Se han discriminado cuatro poblaciones en esta zona: Ch1-Ch4 (Mesulam y col., 1983a,b; 1984).

- Ch1 corresponde al núcleo septal medial, alrededor del 10% de estas neuronas son colinérgicas.
- Ch2 se refiere a la rama vertical de la banda diagonal de Broca, con un 70% de neuronas colinérgicas.
- Ch3 se ubica en la rama horizontal de la banda diagonal de Broca, con sólo un 1% de neuronas colinérgicas.
- Ch4 corresponde al núcleo basal de Meynert (Meynert, 1872; Kölliker, 1896), el cual yace en el medio de la *substancia innominata*, área vagamente definida, ventral al globo pálido, con un 90% de neuronas colinérgicas.

Las neuronas colinérgicas que se mencionaron proyectan a diversas zonas del cerebro, donde se hallan neuronas colinoceptivas, implicadas en diversas funciones:

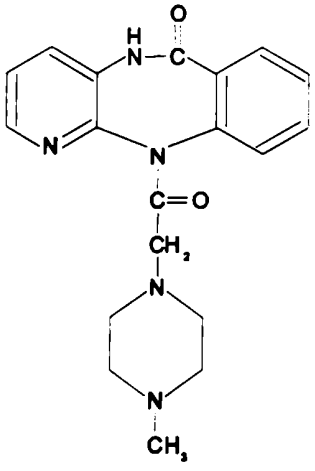
Neuronas del los grupos Ch1-2-3 proyectan fibras que pasan por la estría medular y el tracto habenulointerpeduncular hacia la base del cerebro medio, donde terminan en el núcleo interpeduncular y en el área tegmental ventral (Fibiger, 1982). También las fibras que pasan por la estría medular proyectan al núcleo medial habenular (Gottesfeld y Jacobowitz, 1979).

Los grupos Ch1-2 también envían proyecciones al hipocampo (Lewis y Shute, 1967) por vía del fornix y terminan en el cuerno de Ammón y en la fascia dentada.

Neuronas colinérgicas de Ch2 dirigen también fibras hacia el hipotálamo. Las de Ch3 proyectan hasta las capas externas del bulbo olfatorio.

Las neuronas colinérgicas del grupo Ch4 (anterolateral) por la vía ventral amigdalofugal envían fibras hasta el complejo amigdalino (principalmente al núcleo basal). El resto de Ch4 proyectan a todo el neocortex (Shute y Lewis, 1967; Divac, 1975; Kievit y Kuypers, 1975; Mesulam y Van Hoesen, 1976; Bigl y col., 1982; Mesulam y col., 1983a).

Farmacología de los receptores muscarínicos: otro problema inconcluso



PIRENZEPINA

A principios de la década del '80 se vio que las acciones muscarínicas de la acetilcolina no podían ser explicadas por la existencia de un solo tipo de receptor. La primera explicación fue que los agonistas reconocían distintos sitios, o bien cambiaban el estado del mismo receptor (Raskovsky y col., 1988). En particular, los estudios de fijación específica del radioligando antagonista ^{3}H-pirenzepina (^{3}H-PZ) revelaron diferencias entre los tejidos considerados, sugiriendo la existencia de al menos dos subtipos de receptores diferentes: M_1, con afinidad relativamente alta para pirenzepina, y M_2, con menor afinidad para dicho ligando (Hammer y col., 1980; Hammer y Giachetti, 1982). Sin embargo, la utilización de otro compuesto, 4-difenil acetoxi-metil piperidina methiodide (4-DAMP), reveló la heterogeneidad de los llamados "M_2" en corazón e íleo (Michel y col., 1989; Micheletti y col., 1990), por lo que se necesitó postular la existencia de al menos tres subtipos de receptores muscarínicos para explicar los datos; la clasificación M_1/M_2 basada solamente en la afinidad por

pirenzepina resultó prematura (Birdsall y col., 1983; Caulfield y Straughan, 1983). El descubrimiento y desarrollo de algunos otros antagonistas parcialmente selectivos confirmó la idea de la existencia de tres subtipos de receptores muscarínicos definibles farmacológicamente, que fueron denominados M_1, M_2 y M_3 (para revisiones ver Nathanson, 1987; Hulme y col., 1990; Caulfield, 1993).

El panorama sobre la diversidad de subtipos se fue esclareciendo luego de la aplicación de técnicas de biología molecular, que revelaron la existencia de cinco genes diferentes que codifican distintos subtipos de receptores muscarínicos (Kubo y col., 1986a,b; Bonner y col., 1987). También así se trató de determinar la distribución de los subtipos de receptores en áreas discretas del sistema nervioso, aunque en realidad se determinó, sólo en algunas áreas, dónde se producen o hay mensajeros para determinada proteína.

Aún hoy se continúa intentando determinar la localización precisa de los subtipos de receptores muscarínicos en el sistema nervioso central.

El esfuerzo se dirigió fundamentalmente al estudio de los roles funcionales, características y mecanismos de acción de los subtipos. La carencia de herramientas farmacológicas con buena selectividad ha dificultado el avance en el desarrollo de estas tareas, por lo que su búsqueda constituyó, en los últimos años, uno de los temas principales de investigación en la neurotransmisión colinérgica muscarínica (Caulfield, 1993).

El objetivo general de las investigaciones en subtipos de receptores muscarínicos consiste en asignar un rol particular o función en condiciones nativas (es decir en sistemas naturales como células u órganos que normalmente los expresan). En los últimos años surgió una cantidad apreciable de trabajos con experimentos farmacológicos que utilizan como modelo experimental líneas celulares que no expresan

receptores muscarínicos, transfectadas de tal modo que expresan establemente un tipo particular de receptor. Esto soluciona el problema existente en tejidos y células nativos, que expresan en general múltiples subtipos de receptor, con los correspondientes múltiples sistemas de transducción de señales. Pero es riesgoso asumir que los receptores expresados artificialmente en una línea celular posean características idénticas a los nativos. Las secuencias aminoacídicas de los receptores tienen sitios que pueden ser objeto de modificaciones postraduccionales (como fosforilación y glicosilación) (Parker y col., 1991). También puede ocurrir que la maquinaria bioquímica en este modelo experimental sea distinta cuali- o cuantitativamente de la nativa, como por ejemplo los tipos de proteínas G involucradas, enzimas efectoras, canales iónicos, etc.

La manera más directa y sencilla de discriminar subtipos de receptores en sistemas nativos consiste en ver diferencias en las constantes de disociación de equilibrio o cinéticas para antagonistas, a través de experimentos de fijación específica de radioligandos, o sus afinidades aparentes, en experimentos funcionales. Las constantes de disociación de los experimentos de fijación específica pueden ser datos útiles para las afinidades de los ligandos por el receptor, lo que luego debe ser confirmado en ensayos funcionales en tejidos o células que expresen el receptor de interés.

Desgraciadamente, la investigación sobre los receptores muscarínicos fue más lenta que lo esperado por la carencia de antagonistas con alta selectividad, es decir con muy alta afinidad por un subtipo y muy baja por el resto. Esto conduce a que en la definición de un subtipo particular se incluyan varios valores de constantes de disociación para distintos antagonistas más o menos selectivos (ver Buckley y col., 1989; Hulme y col., 1990; Caulfield, 1993).

La Tabla Intro-B muestra los valores de pK_D de algunos antagonistas parcialmente selectivos para los cinco receptores muscarínicos. Los datos incluyen valores de estudios farmacológicos de fijación específica y funcionales.

TABLA Intro-B

Valores de potencias de antagonistas parcialmente selectivos en experimentos de fijación específica o en ensayos funcionales, expresadas como pK_D (-log K_D).

Gen	m1	m2	m3	m4	m5
Subtipo farmacológico	M_1	M_2	M_3	M_4	—
Compuesto					
Pirenzepina	a/b 7.9-8.2 c 8.1-8.5	a/c 6.3-6.5 b 6.7	a/b 6.7-7.1 c 6.6	a/b 7.1-7.6 c 7.7-8.1	b 6.2-7.1
AF-DX 116	a/b 6.4-6.7 c 6.9	7.1-7.2	a 5.9 c 6.6	a/b 6.6 c 7	b 6.6
Methoctramina	a/b 7.1-7.6 c 6.5	a/b 7.8-8.3 c 7.9	a/b 6.3-6.9 c 6	b 7.4 a 7.8-8.1 c 7.6	b 6.9-7.2
4-DAMP	a/b 8.9-9.2 c 8.6	a/b 8-8.4 c 7.8	a/b 8.9-9.3 c 9.1	a/b 8.9 c 9.4	b 9
Himbacina	a/b 7-7.2 7.2	a/b 8-8.3 c 8.5	a/b 6.9-7.4 c 7.6	a/b 8-8.5 c 8.5-8.8	b 6.3
pFHHSiD	b 7.2-7.7 c 7.2	a/b 6-6.9 c 6	a/b 7.8-7.9 c 7.9	b 7.5	b 7
AF-DX 384	b 7.3-7.5	8.2-9	b 7.2-7.8	b 8-8.7	b 6.3

a: estudios de desplazamiento de radioligandos

b: estudios en receptores clonados en líneas celulares

c: estudios funcionales
Datos revisados por Caulfield (1993) y por Eglen y Watson (1996), de los trabajos: Dörje y col., 1991b; Lazareno y col., 1990; Hulme y col., 1990; Lazareno y Roberts, 1989; Brown y col., 1980; Bernheim y col., 1992; Mitchelson, 1988; Caulfield y Brown, 1991; Lambrecht y col., 1989a,b; Entzeroth y Mayer, 1990; Eglen y col., 1994.

Al analizar los datos de la Tabla Intro-B, se aprecia que no hay mayores discrepancias entre las afinidades determinadas en estudios de fijación específica de radioligandos y las afinidades aparentes obtenidas en los experimentos funcionales. Esto sugiere que las características de los sitios de unión de antagonistas reflejan las características de los receptores acoplados correspondientes. Asimismo, no parece haber grandes diferencias si se comparan los resultados obtenidos con receptores clonados (que se expresan en líneas celulares), con las afinidades obtenidas para los nativos (Hulme y col., 1990; Eglen y Watson, 1996). Esto sugiere que no parecen existir diferencias específicas en las modificaciones postraduccionales del receptor que afecten la afinidad por la unión de antagonistas.

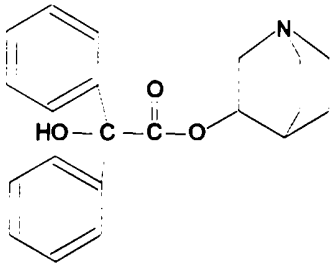
Acerca de cómo se reconocen los fármacos y receptores

En la mayoría de los casos, y para cualquier receptor, se considera que los antagonistas compiten con los agonistas por el sitio específico (sitio agonista u ortostérico), pero existen casos en que la evidencia señala la existencia de un sitio alostérico (sitio cooperativo) en el receptor, el que puede ser ocupado por compuestos con alta afinidad (Matsui y col., 1995).

En el receptor muscarínico está postulada la existencia de un sitio de tipo alostérico, al cual se unen compuestos tales como la gallamina, methoctramina, alcuronium, tacrina y McN-A-343 (Mohr y Tränkle, 1994; Jakubík y col., 1995; Jakubík y Tuček, 1995; Hejnová y col., 1995; Tuček y col., 1995; Tuček y Proška, 1995). Dicho

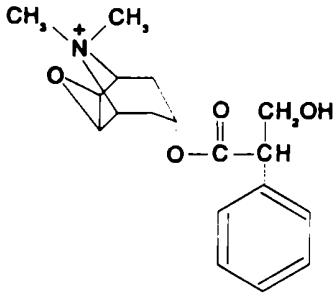
sitio alostérico puede evidenciarse por un decremento en la tasa de disociación de radioligandos competitivos, como ^{3}H-NMS (Hulme y col., 1990; Lee y El-Fakahany, 1991b; Jones y col., 1992; Tuček y Proška, 1995). Los efectos alostéricos se evidenciaron tanto en receptores nativos (Stockton y col., 1983) como en clonados (Lee y El-Fakahany, 1991a). Los resultados parecen indicar que los receptores m2 son más susceptibles a los efectos alostéricos de la gallamina, que son vistos a concentraciones por encima de 10 µM (Tuček y Proška, 1995). Estos ligandos, que se han descripto como cooperativos, también poseen una afinidad apreciable por el sitio agonista, donde la interacción sería competitiva, lo que significa que, si el sitio alostérico altera la acción del agonista (en un sentido funcional), los efectos serían mixtos. Sin embargo, existen casos como el reportado por Ehlert (1988), en que la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa por el agonista oxotremorina, en membranas de miocardio de rata, se modifica por gallamina, tal que su acción puede ser explicada como un efecto exclusivamente alostérico.

En resumen, se puede decir que existen evidencias sobre comportamientos que no responden a la simple ley de acción de masas, especialmente con drogas como gallamina y methoctramina, en experiencias bioquímicas y funcionales, aunque hasta el momento no se haya podido probar la relevancia fisiológica del sitio alostérico en la transmisión muscarínica.

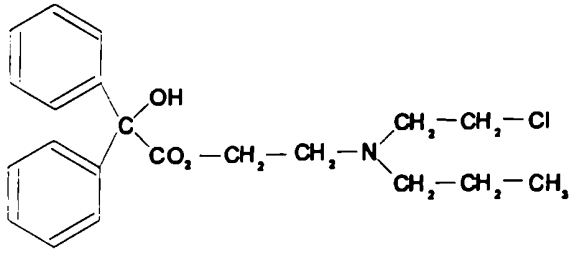


BENZILATO DE QUINUCLIDINA

Desde hace más de dos décadas, el desarrollo de radioligandos con alta especificidad y afinidad para el receptor muscarínico ha sido muy importante en la aproximación al conocimiento del mismo (Sweetnam y col., 1993). La historia muestra muchos reportes sobre la identificación de sitios específicos muscarínicos en muy variados tipos de células y tejidos (ver Nathanson, 1987; Hulme y col., 1991; Caulfield, 1993). Al comienzo, el radioligando más utilizado fue el benzilato de quinuclidina tritiado (^{3}H-QNB), antagonista de alta afinidad y con baja constante de disociación, que se une, sin discriminar, a todos los subtipos de receptor muscarínico (Yamamura y Snyder, 1974a,b). La N-metil escopolamina tritiada (^{3}H-NMS) es otro radioligando con características similares al anterior, pero con constante de disociación algo mayor, y es utilizada muy frecuentemente como ligando equivalente para todos los receptores muscarínicos. Otro antagonista no selectivo muy utilizado es la mostaza de propilbenzilcolina tritiada (^{3}H-PBCM), que se une en forma covalente al receptor muscarínico, siendo esta unión irreversible.



N-METIL ESCOPOLAMINA

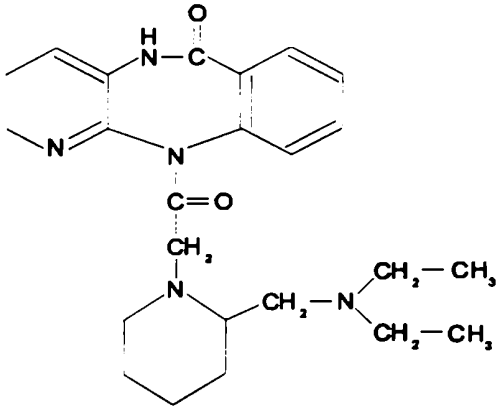


PROPILBENZILCOLINA (mostaza)

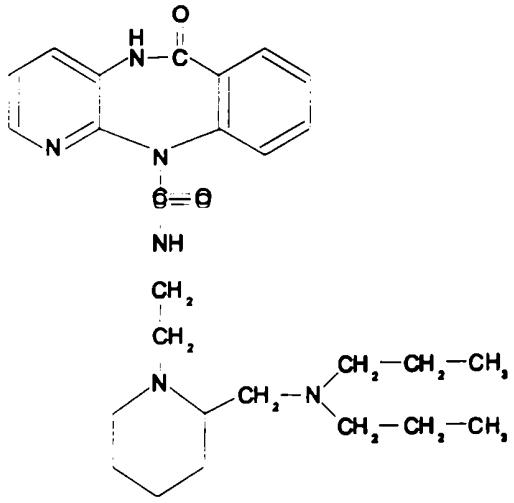
Otro ligando muscarínico de particular interés es la pirenzepina tritiada (^{3}H-PZ) que, como ya se mencionara, fue el primer antagonista descripto como parcialmente selectivo por un subtipo farmacológico de receptor, el

llamado M_1. La pirenzepina presenta alta afinidad por el receptor M_1, y menor por el denominado, en su momento, M_2. La ^{3}H-PZ se une a los receptores muscarínicos predominantes en corteza cerebral, hipocampo y ganglios (M_1) con una afinidad relativamente alta (ver Tabla Intro-B), mientras que en el corazón, glándulas y músculo liso los receptores predominantes presentan una afinidad de un orden de magnitud menor que los anteriores (Hammer y col., 1980; Hammer y Giachetti, 1982).

En 1987 se describió un compuesto derivado de la pirenzepina llamado AF-DX 116 (Micheletti y col., 1989; Mickala y col., 1996). Este antagonista reveló la heterogeneidad de los llamados, hasta ese momento, receptores M_2, dado que posee mayor afinidad por los receptores de corazón —ahora M_2 propiamente dicho— que por los glandulares —ahora M_3— (ver Tabla Intro-B). Un análogo del anterior, ^{3}H-AF-DX 384, con características parecidas, se usa como radioligando relativamente selectivo por los receptores M_2 (Miller y col., 1991; Aubert y col., 1992; Mickala y col., 1996). Otro compuesto ya mencionado, la methoctramina, posee una mayor selectividad y potencia por el subtipo M_2 que los compuestos antes citados (Quaglia y col., 1991; Re y col., 1993; Caulfield, 1993).



AF-DX 116



AF-DX 384

Entonces, un perfil que responde a una alta afinidad por pirenzepina y 4-DAMP, intermedia por *para*-fluoro-hexahidro-siladifenidol (*p*-F-HHSiD; Lambrecht y col., 1989a), y baja por himbacina, methoctramina y AF-DXs es indicativo de receptores del subtipo M_1 farmacológico (ver Tabla Intro-B) (Hulme y col., 1990; Caulfield, 1993; Eglen y Watson, 1996).

Los receptores M_2 son definidos usualmente por una alta afinidad por methoctramina, himbacina y AF-DXs, con una baja afinidad por pirenzepina, 4-DAMP y (*p*-F-HHSiD) (Caulfield, 1993; Eglen y Watson, 1996).

Los receptores M_3 tienen alta afinidad por 4-DAMP y *p*-F-HHSiD, y baja afinidad por pirenzepina, methoctramina y himbacina (Caulfield, 1993; Eglen y Watson, 1996).

Los receptores M_4 son definidos por poseer una afinidad de moderada a alta por pirenzepina y alta por himbacina. Los otros compuestos parcialmente selectivos — methoctramina, 4-DAMP, *p*-F-HHSiD— tienen alta afinidad por estos receptores, lo cual significa que no pueden utilizarse para distinguirlos de M_2 ni de M_3 (Caulfield, 1993; Eglen y Watson, 1996).

Los receptores m5 clonados sólo han sido caracterizados hasta el momento por estudios de fijación específica con radioligandos en células que expresan sólo ese receptor. Datos de Dörje y col. (1991b) en receptores m5 humanos clonados expresados en células CHO, indican que algunos análogos de AF-DX 116, tales como AF-DX 384, AQ RA-741 y AF-DX 250 podrían tener mucha menor afinidad por este subtipo que por cualquier otro receptor muscarínico. Las características farmacológicas

del producto génico m5 parecen diferir de la de los otros (Hosey, 1992). Recientemente, en el sistema de expresión de células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus, Guo y col. (1995) mostraron que la prometazina fue 4 a 7 veces selectiva por este receptor. Aún no se ha establecido si esto es verdad en un sistema de expresión de mamíferos.

Aún no se determinaron las consecuencias funcionales de la activación de este subtipo en condiciones nativas (Hosey, 1992). Lo que se sabe es que es el único subtipo expresado en la *sustancia nigra*, y parece posible que allí medie los efectos estimulatorios de los agonistas muscarínicos en la liberación de dopamina (Weiner y col., 1990). Últimamente se determinó que el receptor muscarínico que media la contracción del íleo aislado de pollo podría representar un correlato funcional del producto génico de m5 (Darroch y Mitchelson, 1995; Eglen y Watson, 1996).

Un dato importante, a esta altura del análisis de los receptores muscarínicos, es que las características farmacológicas de cada subtipo parecen indistinguibles entre distintas especies biológicas (Caulfield, 1993; Eglen y Watson, 1996). Así, existen reportes de afinidades muy similares, tanto en fijación específica de radioligandos como en estudios funcionales, en receptores humanos clonados (Dörje y col., 1991c) y nativos de rata y de conejo (Lazareno y col., 1990).

En resumen, dados los rangos en los valores de las constantes de disociación para un mismo antagonista reportados por diferentes grupos, se evidencia la limitada selectividad que exhiben los antagonistas. Por ello resulta difícil discriminar qué subtipo de receptor está involucrado en cada respuesta. El panorama se complica aún más porque casi siempre se expresa más de un subtipo en cada región y múltiples subtipos pueden, o no, acoplarse a una misma respuesta (Eglen y col., 1987; Kenakin y col., 1992; Richards y van Giersbergen, 1995).

Una aproximación alternativa al problema consiste en el uso de antisueros selectivos. Según lo expresado por Levey y col. (1991; Levey, 1993), éstos serían exquisitamente sensibles para cada subtipo, aunque la distribución de cada subtipo no siempre coincide con la determinada mediante la fijación específica de radioligandos. Los mismos autores plantean que esto podría deberse a la pobre selectividad de los ligandos utilizados, especialmente en los estudios que estiman proporciones entre los subtipos M_2 y M_4. Posiblemente también deban refinarse los métodos inmunohistoquímicos que se utilizan en la actualidad

Debido a los estudios de biología molecular, la caracterización de las diferencias entre subtipos del receptor puede ahora ser extendida más allá de las relaciones estructura-actividad de los antagonistas, para incluir elementos clave de la estructura del receptor que especifican características distintivas y que pueden resultar en cierta selectividad por antagonistas.

Así se sabe que la unión de antagonistas y agonistas probablemente involucre un cierto número de residuos aminoacídicos ubicados en una hendidura formada por las secuencias transmembranales del receptor (ver Discusión General). Además, las moléculas agonistas y antagonistas poseen una parte catiónica (que sería análoga al nitrógeno cuaternario de la acetilcolina) que forma un puente iónico con un residuo aspartato (105) en la tercera hélice transmembranal (TMIII), conservado en los cinco subtipos de receptor, así como en todos los receptores de aminas catiónicas, y al cual se unen los análogos de la propilbenzililcolina (Curtis y col., 1989; Jones y col., 1992). La quinta hélice transmembranal (TMV) posee conservados también dos residuos de alanina, las que se sugiere serían homólogas a dos serinas presentes en el receptor β-adrenérgico, que formarían puentes de hidrógeno con el grupo catecol OH de la

noradrenalina. Análogamente, estas dos alaninas podrían participar en la interacción del receptor con el grupo metilo de la acetilcolina (Hulme y col., 1993).

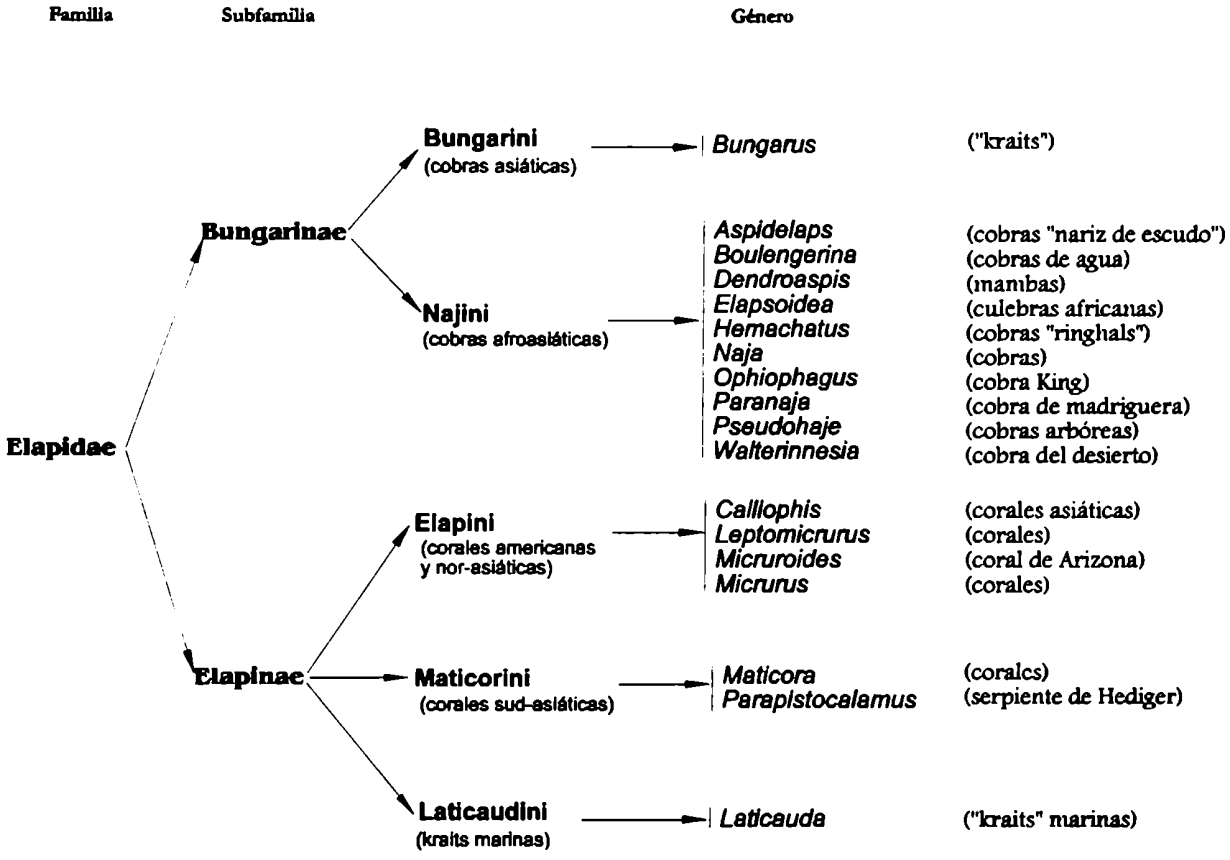
En un análisis ulterior se discriminaron varios residuos aminoacídicos conservados, con posibilidad de intervenir en la unión de la acetilcolina al receptor. Éstos se encuentran en las regiones transmembranales TMV (dos residuos de treonina), TMVI (una tirosina y una asparragina) y TMVII (dos tirosinas). Los residuos mencionados podrían actuar como donores/aceptores en uniones puentes de hidrógeno y se encuentran conservados, varios de ellos únicos en los receptores muscarínicos (Hulme y col., 1993).

Ofidios, o los fabricantes de toxinas

Las serpientes (Clase Reptilia, Orden Squamata) hicieron su aparición en el escenario evolutivo durante el período cretácico, hace aproximadamente 100-120 millones de años, aunque las serpientes venenosas son de aparición relativamente tardía: en el mioceno, hace menos de 30 millones de años (Harris, 1991). Según distintos criterios, las aproximadamente 3200 especies de ofidios pueden agruparse entre 11 y 13 familias, aunque las aproximadamente 1300 especies de serpientes con venenos pertenecen sólo a 5 familias: Elapidae, Hydrophiidae, Viperidae, Crotalidae y Colubridae (Harris, 1991; Hider y col., 1991).

Es bien sabido que los venenos de ciertos ofidios constituyen fuentes ricas en sustancias que afectan la neurotransmisión en forma específica.

La familia que aquí nos interesa es Elapidae, característica de serpientes venenosas y con representantes en las tres Américas, África, Asia y Oceanía, y a la cual pertenecen las cobras, "kraits", corales y mambas (ver Figura y para más detalles Mengden, 1983; Endo y Tamiya, 1991).



Los venenos de las mambas están entre los más estudiados, debido a las interesantes acciones neurotóxicas de sus componentes. Existen cuatro especies de mambas, todas del continente africano y pertenecientes al género *Dendroaspis*: la mamba negra (*D. polylepis*), la mamba verde occidental (*D. viridis*), la mamba verde oriental (*D. angusticeps*) y la mamba de Jameson (*D. jamesoni*).

Mamba verde oriental (*Dendroapis angusticeps*)

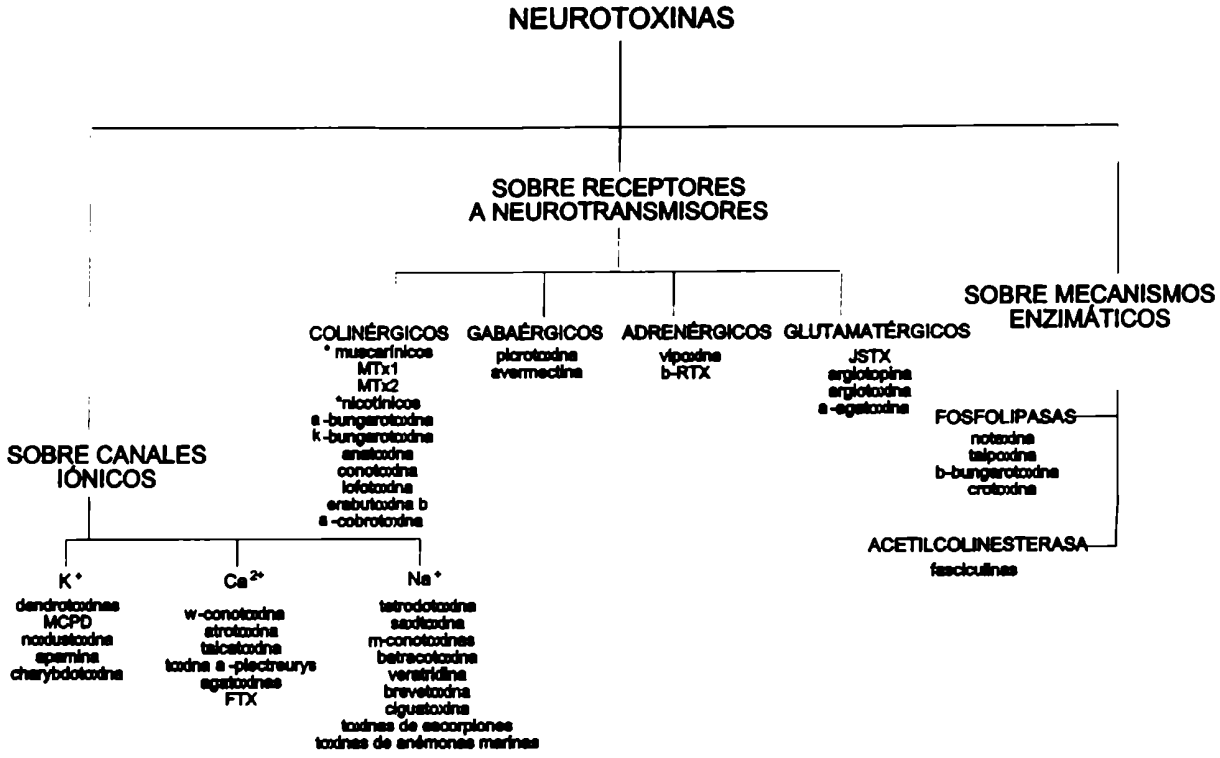
El veneno de *D. angusticeps* es aproximadamente diez veces menos mortal que el de las otras tres mambas, y esto sugiere que posee diferencias cualitativas y/o cuantitativas en cuanto a la composición de toxinas en su veneno (Harvey y Karlsson, 1982, 1984); no obstante, en algunos casos se pueden encontrar toxinas homólogas presentes en los otros venenos.

El veneno de la mamba verde oriental (*Dendroaspis angusticeps*) tiene efectos diversos sobre la preparación de placa motora de músculo esquelético a distintas concentraciones: a bajas concentraciones el veneno incrementa la amplitud de las contracciones fásicas evocadas indirectamente por la estimulación del nervio; a concentraciones intermedias reduce la sensibilidad a la acetilcolina, es decir que hay signos de bloqueo de los receptores nicotínicos; a concentraciones más altas inhibe la contractilidad y causa daño muscular (Harvey y Karlsson, 1980; 1984). Desde

principios de la década del '80 varios grupos han realizado diversos estudios de individualización y caracterización y lograron hallar péptidos que producen efectos discretos en las sinapsis. Entre otros componentes se han encontrado toxinas que afectan la neurotransmisión en algún nivel:

1. Toxinas facilitatorias de la neurotransmisión, que incrementan la liberación de acetilcolina en respuesta a la estimulación del nervio, por bloqueo de canales de K^+ dependientes de voltaje presentes en el terminal nervioso. Fueron llamadas dendrotoxinas (DTx) (Harvey y Karlsson, 1980, 1982, 1984; Harvey y Anderson, 1985; Harvey, 1991).
2. Toxinas anticolinesterásicas, inhibidoras irreversibles de la acetilcolinesterasa (AChE), selectivas por algunos tipos de enzima. Fueron denominadas fasciculinas (FAS) por producir fasciculaciones de las fibras musculares (Rodríguez-Ithurralde y col., 1983; Karlsson y col., 1984, 1985; Dajas y col., 1988).
3. Toxinas bloqueantes de canales de Ca^{2+}, selectivas por el tipo L de canales. Se denominaron calciseptinas (De Weille y col., 1991).
4. Toxinas muscarínicas (MTx), de las que se ocupa el presente trabajo.

Con fines ilustrativos, en el siguiente esquema se pretende dar una imagen global sobre la existencia de toxinas de origen animal, mostrando ejemplos de toxinas que presentan acciones sobre componentes del sistema nervioso, es decir, sobre canales iónicos, receptores de neurotransmisores y mecanismos enzimáticos:



Toxinas que actúan sobre el receptor muscarínico

A fines de la década del '80 un grupo de investigadores descubrió que el veneno de *D. angusticeps* es capaz de inhibir la fijación específica del radioligando muscarínico ^{3}H-QNB a membranas de corteza cerebral (Adem y col., 1988). Por métodos cromatográficos lograron aislar dos péptidos de aproximadamente 7000 Da, que inhibieron parcialmente la unión de ^{3}H-QNB, lo que llevó a pensar en una posible selectividad de los mismos por algún subtipo de receptor muscarínico. No existían evidencias previas de este hecho. Para el receptor nicotínico, en cambio, sí se habían encontrado toxinas específicas en los venenos de cobras, mambas y serpientes marinas, las α-toxinas. La estrategia utilizada para el aislamiento de las toxinas muscarínicas se

basó en las propiedades de tamaño (filtración en gel), de carga (intercambio iónico) e hidrofobicidad (HPLC), encontrándose en el último paso de purificación dos picos con actividad muscarínica, correspondientes a los dos péptidos, cuya homogeneidad fue corroborada por HPLC (Adem y col., 1988). Estas proteínas fueron bautizadas MTx1 y MTx2, por "muscarinic toxins", y se enumeraron de acuerdo al orden de elución en el paso cromatográfico en el cual ambas se separan.

Inmediatamente nuestro grupo comenzó a trabajar con estas toxinas, analizando sus particularidades farmacológicas. Se vio que eran capaces de inhibir parcialmente la fijación del radioligando no selectivo ^{3}H-QNB, en mayor medida en membranas sinaptosomales de corteza cerebral (50%) que de tallo cerebral (20%). Sumada a esta evidencia se observó que la inhibición de la unión del radioligando parcialmente selectivo ^{3}H-PZ resultó casi total, lo que sugirió que estos péptidos podrían unirse selectivamente al subtipo farmacológico de receptores muscarínicos M_1, con mayor afinidad por PZ y más abundantes en la corteza que en el tallo cerebral (Jerusalinsky y col., 1992a).

En un primer análisis estructural de estas toxinas, se reportó que estaban formadas por 64 aminoácidos MTx1 y 63 MTx2, con pesos moleculares calculados a partir de su composición de 7201 y 6839 Da, respectivamente, y sin grupos sulfhidrilos libres (Adem y col., 1988; Jerusalinsky y col., 1989a,b). Posteriormente, a principios de esta década, se han realizado sus secuenciaciones. MTx2 fue secuenciada por dos grupos en forma independiente y utilizando diferentes estrategias. Ducancel y col. (1991) dedujeron la forma precursora de MTx2 a partir de un clon de cDNA obtenido por búsqueda con una sonda de secuencia conocida a partir de datos previos, en una biblioteca de cDNA de RNA mensajeros de la glándula del veneno de la serpiente. Karlsson y col. (1991) procedieron a la purificación de MTx2 a partir del veneno y luego

realizaron su secuenciación aminoacídica por métodos químico-orgánicos. Ambos grupos llegaron a los mismos resultados. La toxina MTx2 tiene 65 aminoácidos con 8 residuos de cisteína, que presumiblemente forman 4 puentes disulfuro. Es llamativa la semejanza de esta toxina con otras también presentes en el veneno de elápidos, como son las α-toxinas curaremiméticas de cadena corta, las dendrotoxinas, las fasciculinas y las citotoxinas.

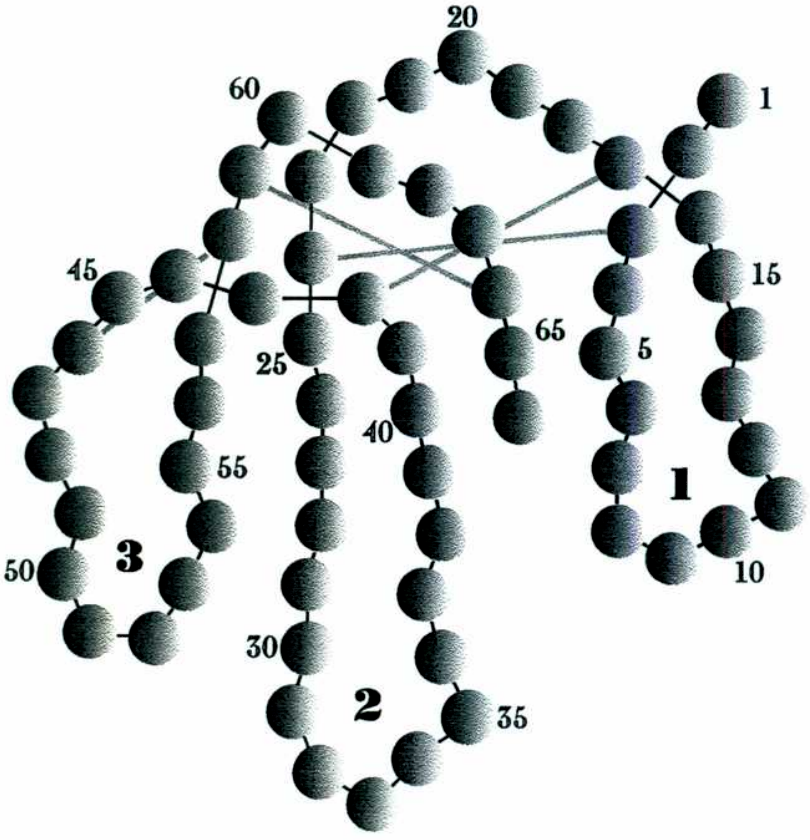


Figura Intro-5
Estructura de las toxinas "three fingered", entre las que se encuentran las α-neurotoxinas curaremiméticas, las dendrotoxinas, las fasciculinas y las toxinas muscarínicas. Las moléculas presentan 4 puentes disulfuro, que forman una región "core". Las zonas intermedias se pliegan para formar tres "loops", que confieren un aspecto de "tres dedos".

Este conocimiento lleva a la idea de la existencia de una superfamilia de péptidos presentes en los venenos de las serpientes de esta familia, todos con el mismo tamaño aproximado, con el mismo patrón de puentes disulfuro y el mismo plegamiento. La Figura Intro-5 esquematiza la estructura terciaria de estas toxinas, análoga a las α-

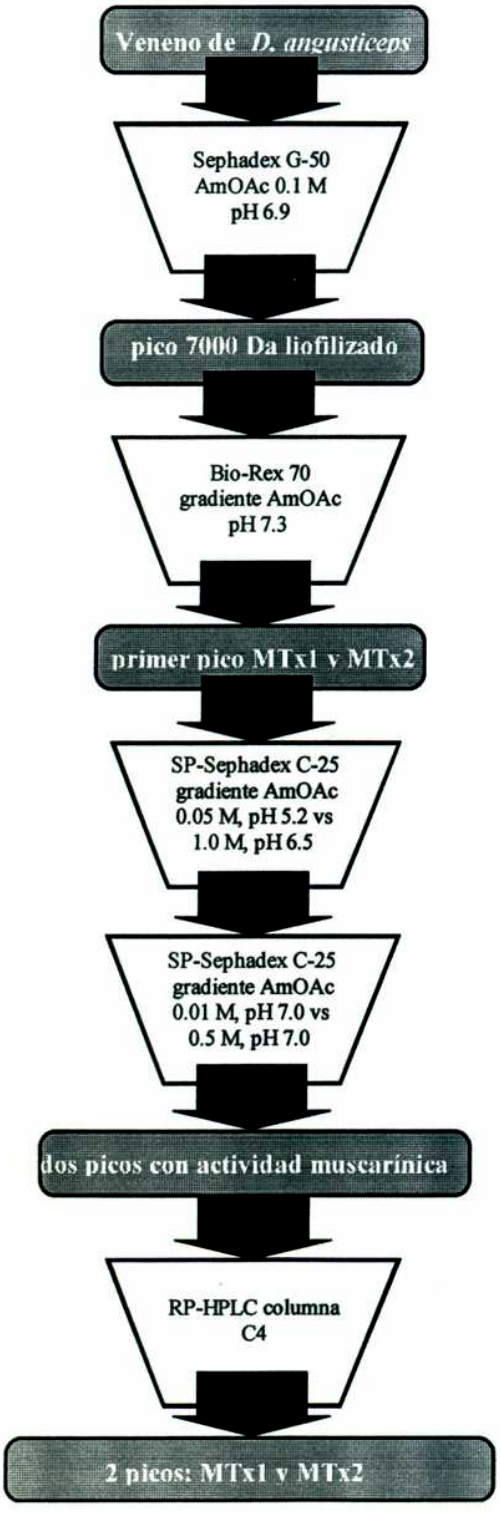
neurotoxinas bien conocidas, con 3 "loops" adyacentes ricos en estructura secundaria en hoja β-plegada y conectados a un pequeño corazón globular con los mencionados puentes disulfuro. Posteriormente, se ha determinado con mayor precisión la estructura tridimensional de la toxina MTx2 por técnicas de resonancia magnética nuclear y modelado molecular (Ségalas y col., 1995a), confirmándose esas apreciaciones.

No obstante la homología existente entre esta variedad de toxinas, las MTxs reconocen a los receptores muscarínicos, mientras que las α-neurotoxinas reconocen a los nicotínicos y ambas derivarían de un gen ancestral común.

Las toxinas curaremiméticas poseen 13 residuos conservados y se postuló su importancia como sitio de unión al receptor nicotínico; sólo dos de esos aminoácidos se encuentran en la secuencia de MTx1 y MTx2, y esta característica conferiría su diferente especificidad (Ducancel y col., 1991; Karlsson y col., 1994).

Materiales & Métodos

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS TOXINAS MUSCARÍNICAS



El veneno liofolizado de *Dendroaspis angusticeps* se obtuvo de Jabria, B. V., Harderwijk, Holanda. El procedimiento general utilizado para aislar las fracciones con actividad muscarínica fue descripto por Karlsson y colaboradores (Adem y col., 1988). El veneno se disolvió en acetato de amonio (AmOAc) 0.10 M, pH 6.9, se filtró en gel Sephadex G-50 (Pharmacia-LKB, Biotechnology, Suecia) en el mismo buffer, y los tubos del pico de proteína conteniendo los péptidos que eluyen con los pesos moleculares cercanos a 7000 Da, se colectó junto y se liofilizó. En esta fracción también están presentes algunos polipéptidos neuroactivos, tales como las dendrotoxinas (Harvey y Karlsson, 1980) y las fasciculinas (Rodríguez-Ithurralde y col., 1983).

El paso próximo fue una cromatografía de intercambio catiónico en Bio-Rex 70, 400 mesh (Bio Rad Laboratories), equilibrada con AmOAc 0.20 M, pH 7.3, y luego lavada con 100 ml de AmOAc 0.03 M, pH 7.3. La muestra se disolvió en el mismo buffer para su aplicación a la

columna, la cual se lavó subsecuentemente con 100 ml de buffer AmOAc 0.03 M, hasta que el registro alcanzara la línea de base, antes de la aplicación de un gradiente de concentración de AmOAc a pH 7.3 para el aislamiento de los diversos péptidos. Las MTxs no se unieron al intercambiador catiónico bajo estas condiciones, y así las fracciones excluídas fueron colectadas juntas y liofilizadas.

Los dos pasos siguientes de cromatografía de intercambio catiónico se realizaron acorde con el procedimiento original, con ligeras modificaciones (Adem y col., 1988). Los gradientes para los pasos de cromatografía de baja presión se formaron con un mezclador de gradientes Ultrograd (LKB, Bromma, Suecia). La fracción del Bio-Rex 70 se disolvió en AmOAc 0.05 M, pH 5.2, y se sembró en una columna SP Sephadex C-25, equilibrada con el mismo buffer. Se eluyó con un gradiente lineal de AmOAc, de 0.05 M, pH 5.2, hasta 1.0 M, pH 6.5, como se describe en la Figura I-1 del capítulo I de los resultados. Las fracciones del pico proteico que mostraron actividad muscarínica fueron colectadas juntas, se ajustó el pH a 7.4 con NH_4OH 1 M y luego se liofilizaron.

Esta muestra fue sometida a un segundo paso en SP Sephadex C-25, equilibrado con AmOAc 0.01 M, pH 7.0; se eluyó con un gradiente lineal de AmOAc, de 0.01 M, pH 7.0, hasta 0.5 M, pH 7.0, como se muestra en la Figura I-2 de Resultados. Dos picos proteicos correspondientes a las supuestas MTxs y designados MTx1 y MTx2, de acuerdo con su orden de elución, mostraron la actividad muscarínica que luego se describirá.

La pureza de las fracciones aisladas se corroboró por HPLC en fase reversa (RP), usando una columna Bakerbond WP-Butyl (C_4), 4.6 x 50 mm (J. T. Baker Co., U. S. A.), realizando un gradiente lineal de AmOAc 0.1 M (Buffer A) hasta AmOAc 0.1 M/2-propanol 40% (Buffer B) para la elución de las muestras, como se describe en la Figura I-3 de Resultados.

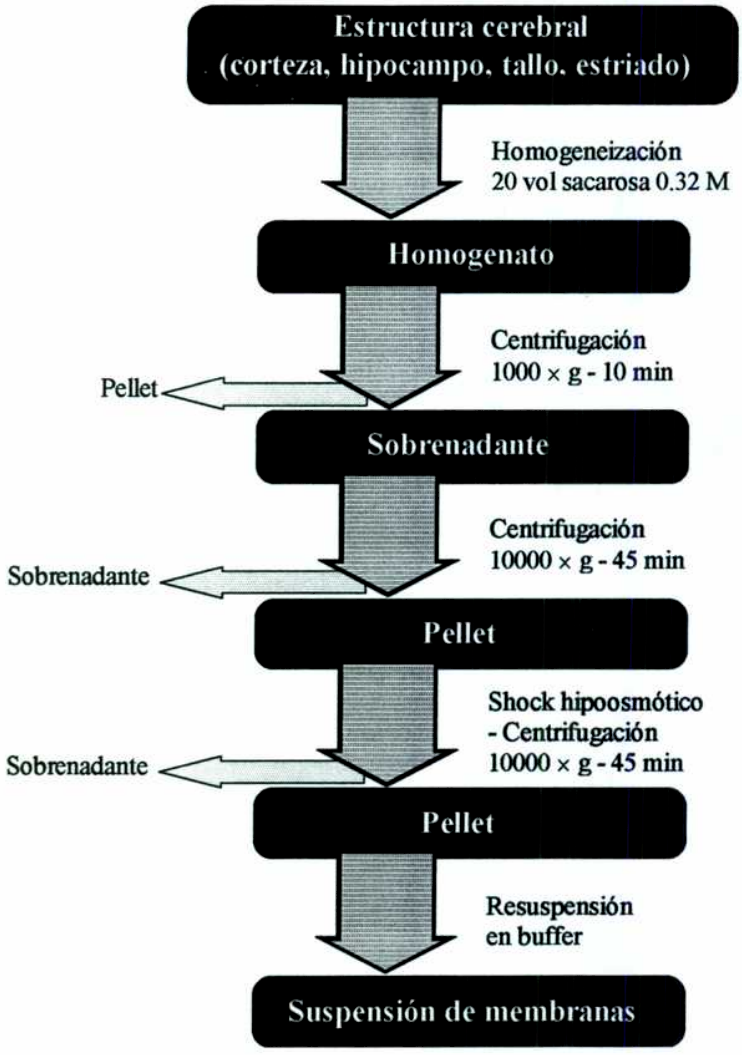
Determinación de aminoácidos

Muestras de MTx1 y MTx2 se hidrolisaron con HCl 6 N en fenol a 110°C por 24 hs. Los hidrolisados se procesaron en un autoanalizador Beckman con medición de absorbancia en u.v., para calcular las relaciones molares y, por aproximación, el número entero más cercano fue considerado el más probable.

El análisis de la secuencia N-terminal de MTx2 se realizó usando un secuenciador automático de fase gaseosa (Applied Biosystems Protein Sequencer 477).

PREPARACIÓN DE MEMBRANAS PARA LOS ENSAYOS DE FIJACIÓN ESPECÍFICA

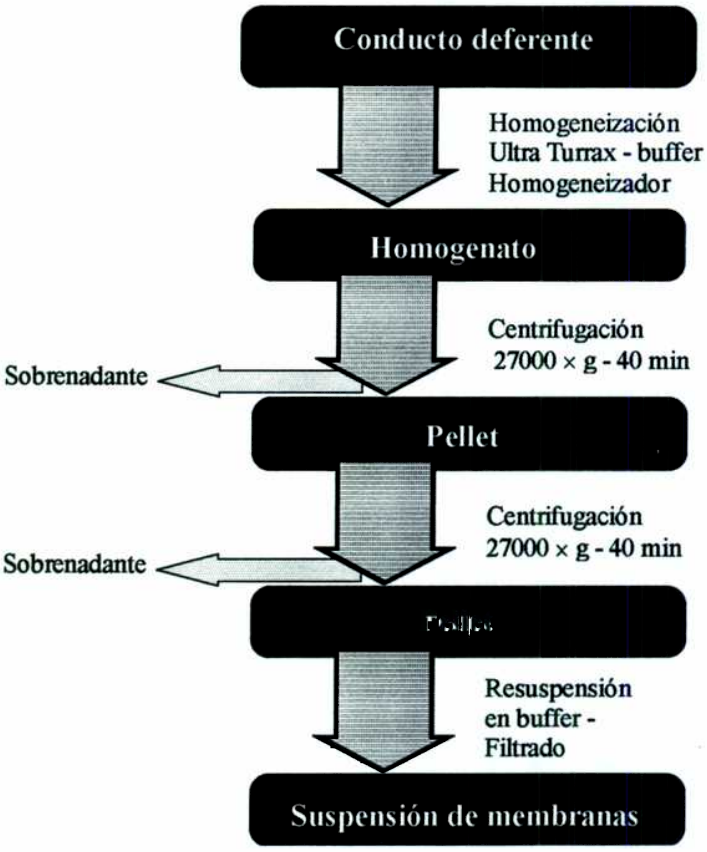
Preparación de membranas sinaptosomales de corteza cerebral, tallo cerebral, hipocampo y estriado



Se prepararon membranas sinaptosomales crudas de las estructuras cerebrales de rata mencionadas, siguiendo el procedimiento original de De Robertis y colaboradores (De Robertis y col., 1966), con algunas modificaciones. El tejido se homogeneizó en 20 volúmenes de sacarosa 0.32 M en homogeneizador con potter de vidrio y vástago de teflón, en tres o cuatro operaciones de diez bajadas cada una. El homogenato se centrifugó a 1000 × g durante 10 min, siendo descartado el pellet. El sobrenadante se centrifugó nuevamente, esta vez a 100000 × g durante 45 min. El pellet resultante se resuspendió en 20 volúmenes de buffer PO_4^{3-}, K^+, Na^+ 50 mM, pH 7.4 y se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones anteriores. El pellet resultante de esta segunda bajada se resuspendió en el mismo

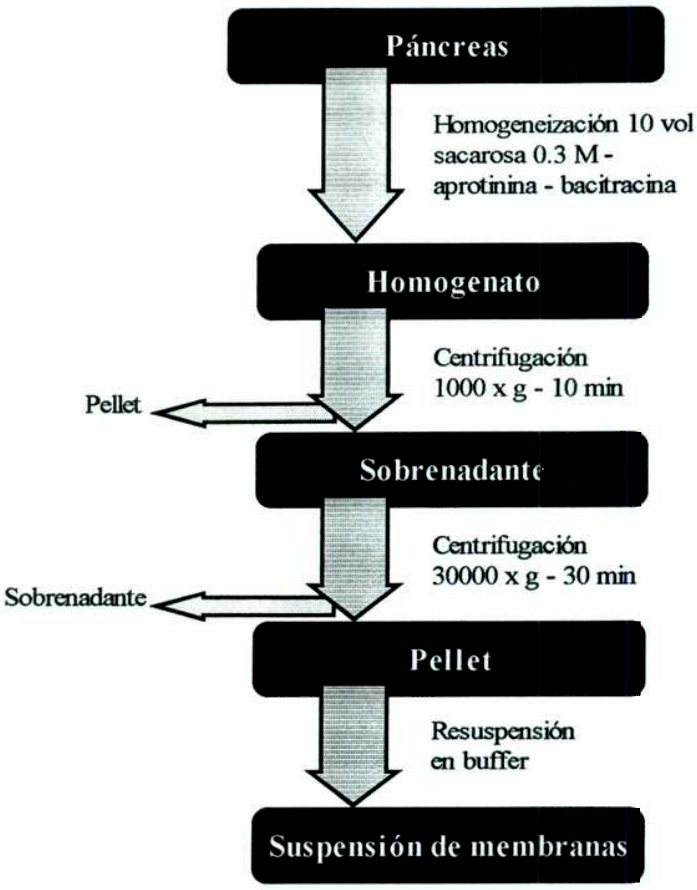
buffer, de manera tal de obtener una concentración de proteínas alrededor de 3-4 mg/ml, determinada por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). La suspensión de membranas sinaptosomales se guardó alicuotizada a -70°C hasta su utilización.

Preparación de membranas de conducto deferente



Se prepararon membranas de conducto deferente de rata para los ensayos de fijación específica de radioligandos. Luego de disectar los conductos deferentes se homogeneizaron en Ultra Turrax a velocidad mediana en buffer Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7.4 o buffer PO_4^{3-}, K^+, Na^+ 50 mM, pH 7.4 y luego homogeneizados en homogeneizador con potter de vidrio y vástago de teflón. El homogenato se centrifugó a 30000 × g durante 40 min y el pellet se resuspendió y volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Luego de resuspender el pellet, se filtró a través de gasa y se lo llevó al volumen correspondiente para obtener una concentración de proteínas de alrededor de 0.3-0.7 mg/ml, determinada por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). La suspensión de membranas se usó el mismo día en los ensayos de fijación específica de radioligandos.

Preparación de membranas de páncreas



Se prepararon membranas de páncreas de rata para los ensayos de fijación específica. Luego de disectar el páncreas se homogeneizó en 10 volúmenes de sacarosa 0.3 M, aprotinina 1.1 TIU/ml, bacitracina 100 μM. El homogenato se centrifugó a 1000 × g durante 10 min y al sobrenadante se le agregó buffer PO_4^{3-}, K^+, Na^+ 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, aprotinina 0.55 TIU/ml, bacitracina 100 μM, BSA 0.5%, pH 7.4 y se lo centrifugó a 30000 × g durante 30 min. El pellet se resuspendió en el mismo buffer, de manera de obtener una concentración de aproximadamente 2 mg/ml.

Determinación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó según el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Como patrón se utilizaron curvas estándares utilizando soluciones de albúmina de suero bovina (BSA, Sigma).

RECEPTORES MUSCARÍNICOS CLONADOS:

Con el fin de evaluar la posible selectividad de las toxinas, utilizamos subtipos puros de receptores muscarínicos humanos de dos fuentes:

- subtipos m1 y m2 de receptor producidos en células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus recombinante, purificados y reconstituídos en membranas artificiales (Parker y col., 1991), obtenidos por gentileza del Dr. Gabriel Berstein (Univ. Texas).

Esta preparación fue homogeneizada en vidrio-teflon con buffer PO_4^{3-}, K^+, Na^+ 50 mM pH 7.4 y diluída hasta obtener una concentración de 0.08 mg de proteína/ml para el subtipo m1 y de 0.055 mg de proteína/ml para el subtipo m2. Se utilizaron alícuotas de 0.5 ml para los ensayos de fijación de radioligandos.

- subtipos m1, m2, m3, m4 y m5 de receptor expresados en membranas de células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus, comprados a BioSignal Inc. (Montreal, Canadá).

Este tipo de preparación fue diluída en buffer Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.4, sin necesidad de homogeneización, hasta obtener concentraciones de 0.02 mg de proteína/ml para el subtipo m1, 0.01 mg de proteína/ml para el subtipo m2, 0.025 mg de proteína/ml para el subtipo m3 y 0.01 mg de proteína/ml para el subtipo m4. Se utilizaron alícuotas de 0.5 ml para los ensayos de fijación de radioligandos.

ENSAYOS DE FIJACIÓN ESPECÍFICA:

Estos ensayos se basan en la especificidad que poseen ciertas moléculas, en general marcadas radioactivamente, de unirse a blancos moleculares deseados, con lo se puede determinar sus características al unirse (Bennet, 1978; Yamamura y col., 1978; Bennet y Yamamura, 1985). Pueden dividirse en dos tipos:

- Experimentos de equilibrio:
  - Curvas de inhibición
  - Curvas de saturación
- Experimentos cinéticos:
  - Curvas de asociación
  - Curvas de disociación

Experimentos de inhibición

En este tipo de experimentos se incubaron membranas o alícuotas de receptores puros con una concentración constante del radioligando, cercana a su valor de K_D y se van agregando concentraciones variables de la droga fría, la que actúa como inhibidor. Los pasos seguidos pueden enumerarse:

1. dilución de las membranas o receptores puros en el buffer correspondiente y hasta su concentración adecuada.

2. siembra de las alícuotas correspondientes en cada caso en tubos de ensayo.

3. agregado de concentraciones crecientes de la droga fría (inhibidor) por duplicado. Se preparó también un juego por quintuplicado sin la adición de la droga fría, destinándose tres tubos para determinar la unión total del ligando y dos para la unión inespecífica (con exceso de droga fría). La unión específica se estimó sustrayendo el valor de la unión inespecífica de la total.

4. agregado a todos los tubos de la concentración adecuada del radioligando.

5. incubación de los tubos a la temperatura y durante el tiempo adecuados.

6. finalización del ensayo diluyendo el contenido de cada tubo con 5 ml del mismo buffer a 4°C e, inmediatamente filtrado a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B) en un aparato Millipore con bomba de vacío. Los filtros se lavaron tres veces con el mismo buffer y se colocaron en viales para uso en contadores de centelleo líquido.

7. secado de los filtros en estufa.

8. adición de 3 ml de PPO-xileno (5 g/l) y lectura de cada muestra en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

Experimentos de saturación

En este tipo de experimentos se incubaron membranas o alícuotas de receptores puros con concentraciones variables del radioligando, en presencia o ausencia de una concentración fija de la droga que actúa como inhibidor.

Los pasos 1-2 son idénticos a los del ítem anterior.

3-4. agregado de concentraciones crecientes de radioligando por sextuplicado, destinándose dos tubos para la unión total, dos para la inespecífica y dos para la total mas el agregado de la droga inhibidora.

Los pasos 5-8 son idénticos a los del ítem anterior.

Experimentos de asociación

En este tipo de experimentos se incubaron membranas o alícuotas de receptores puros con una concentración determinada de radioligando, durante períodos variables.

Los pasos 1-2 son idénticos a los de los ítems anteriores.

3-4. agregado de una concentración determinada de radioligando por triplicado, destinándose dos tubos para la unión total y uno para la inespecífica.

5. incubación de los tubos durante tiempos variables.

Los pasos 6-8 son idénticos a los de los ítems anteriores.

Experimentos de disociación

En este tipo de experimentos se incubaron membranas o alícuotas de receptores puros con una concentración determinada de radioligando durante el período adecuado, para luego disociarlo durante períodos variables.

Los pasos 1-2 son idénticos a los de los ítems anteriores.

3-4. igual al ítem anterior.

5. incubación de los tubos a la temperatura y durante el tiempo adecuados.

6. comienzo de la disociación con el agregado de atropina 250 µM. Filtración de las muestras a tiempos variables.

7-8. igual a los ítems anteriores.

Radioligandos

Se realizaron experimentos de fijación específica de radioligandos (Yamamura y col., 1978; Bennet y Yamamura, 1985), la mayoría muscarínicos. Varios de estos marcadores se utilizaban cotidianamente en el laboratorio antes del desarrollo de este trabajo, otros, en cambio, se utilizaron por vez primera, para los cuales fue necesario desarrollar la serie de pruebas para establecer las condiciones óptimas de los ensayos

(tipo de buffer, concentración de membranas o de receptor, tiempo y temperatura de incubación, etc).

Los radioligandos utilizados en este trabajo fueron:

Antagonistas muscarinicos no selectivos:

- Benzilato de quinuclidina tritiado (^{3}H-QNB) (NEN, 45.4 Ci/mmol)
- N-metil escopolamina tritiada (^{3}H-NMS) (NEN, 79.5 Ci/mmol)

Antagonista muscarínico no selectivo e irreversible:

- Propilbenzililcolina, mostaza tritiada (^{3}H-PBCM) (NEN, 74 Ci/mmol)

Antagonistas muscarínicos parcialmente selectivos:

- Pirenzepina tritiada (^{3}H-PZ) (NEN, 86.2 Ci/mmol)
- AF-DX 384 tritiado (^{3}H-AF-DX 384) (NEN, 118.5 Ci/mmol)

Antagonista adrenérgico parcialmente selectivo:

- Prazosin tritiado (^{3}H-PRZ) (NEN, 71.8 Ci/mmol)

Condiciones de ensayo

Las condiciones utilizadas en los experimentos dependieron del tipo de radioligando y del tipo de preparación del receptor (es decir, receptor nativo en membranas sinaptosomales u homogenato, o receptores clonados puros incorporados en membranas artificiales).

Membranas sinaptosomales de corteza cerebral, tallo cerebral, hipocampo y estriado:

En estas preparaciones se utilizaron las siguientes condiciones:

Radioligando	^{3}H-QNB	^{3}H-NMS	^{3}H-PBCM	^{3}H-PZ	^{3}H-AF-DX 384	^{3}H-PRZ
Buffer	PO_4^{3-}, Na^+, K^+ 50 mM, pH 7.4	PO_4^{3-}, Na^+, K^+ 50 mM, pH 7.4	PO_4^{3-}, Na^+, K^+ 50 mM, pH 7.4	PO_4^{3-}, Na^+, K^+ 50 mM, pH 7.4	PO_4^{3-}, Na^+, K^+ 50 mM, pH 7.4	Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7.4
Concentración de proteína - Vol. incubación	0.1 mg/ml 0.5 ml	0.1 mg/ml 0.5 ml	0.25 mg/ml 0.5 ml	0.5 mg/ml 1 ml	0.5 mg/ml 0.5 ml	0.25 mg/ml 1 ml
Tiempo de incubación para el equilibrio	60 min	60 min	60 min	90 min	90 min	30 min
Rango de saturación	0.05-2 nM	0.05-2 nM	0.1-10 nM	0.25-5 nM	0.3-10 nM	0.05-2 nM
Inespecíficos	Atropina 250 µM	Atropina 250 µM	Atropina 250 µM	Pirenzepina 250 µM	Atropina 250 µM	Prazosin 25 µM

Radioiodinación de MTx2 y experimentos de fijación específica

Se marcó a la toxina MTx2 con ^{125}INa (NEN) siguiendo el método de Greenwood y col. (1963). La toxina ^{125}I-MTx2 se purificó por RP-HPLC, en la cual se obtuvieron tres picos diferentes. Se seleccionó para los ensayos de fijación específica el pico más homogéneo, con la potencia inhibitoria mayor y con el tiempo de retención más cercano al péptido original. Se obtuvieron actividades específicas entre 59 y 76 µCi/µg (entre

406 y 520 Ci/mmol). La radioactividad se midió en un contador gamma, con una eficiencia del 60%.

Para evaluar la capacidad de unión de ^{125}I-MTx2 se utilizaron fracciones sinaptosomales crudas (ver el ítem anterior) o bien membranas sinaptosomales purificadas, obtenidas por centrifugación de las fracciones crudas en gradientes discontínuos de sacarosa (De Robertis y col., 1966). Se incubaron alícuotas de membranas conteniendo 0.5 mg de proteína/ml a 4°C durante 2 h hasta alcanzar el estado estacionario. Los ensayos de saturación se realizaron utilizando un rango de 0.8 hasta 80 nM de ^{125}I-MTx2 (concentraciones estimadas).

La unión inespecífica se determinó agregando MTx2 10 µM no marcada a muestras equivalentes. Alícuotas similares se incubaron con atropina 10 µM. Los ensayos se finalizaron por filtración a través de filtros Whatman GF/B, previamente incubados con polietilenimina 0.02% durante 1h a 4°C con el fin de reducir la unión inespecífica a ellos.

Experimentos de fijación específica de radioligandos a cortes de cerebro de rata

Una vez extraídos, los cerebros de rata fueron protegidos incubándolos durante 30 min en una solución de sacarosa 0.32 M, siendo luego congelados a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Para la obtención de cortes de cerebro se utilizó un crióstato Leitz refrigerado a -20°C. Se realizaron cortes sagitales de 12 µm de espesor, montados en portaobjetos previamente gelatinizados. Los cortes fueron rotulados y almacenados a -70°C hasta su utilización.

Los cortes se preincubaron durante 30 min a 20°C en coplins plásticos con un volumen final de 5.5 ml de buffer PO_4^{3-}, Na^+, K^+ 50 mM, pH 7.4. Para la determinación de la unión específica del radioligando, los cortes se incubaron 60 min a 20°C en los coplins conteniendo ^{3}H-NMS 0.5 nM. Paralelamente, se incubaron cortes de una forma similar, pero en presencia de atropina 100 µM, con el objetivo de determinar la unión inespecífica. Al finalizar la incubación los cortes se lavaron tres veces en buffer PO_4^{3-}, Na^+, K^+ 50 mM, 15 segundos cada vez, y una vez más en agua bidestilada durante un segundo; todos los lavados se realizaron sobre hielo.

La concentración de radioligandos utilizada se escogió teniendo en cuenta las correspondientes constantes de disociación aparentes (K_Ds), de acuerdo con los datos de la bibliografía consultada y de acuerdo también con experimentos previos de unión específica realizados en el laboratorio.

Obtención de autorradiogramas de la fijación de radioligandos muscarínicos:

Después de lavados, los cortes se secaron bajo una corriente de aire. Se los ubicó dentro de un chasis para rayos X. Por sobre los cortes se colocó una película ultrasensible a tritio (^{3}H-Hyperfilm, Amersham). Junto con ellos se expuso un estándar autorradiográfico de alta resolución para así poder hacer la cuantificacion densitométrica.

Se expuso el film durante 21 días a 20°C para aquellos incubados con ^{3}H-NMS 500 pM. Se reveló mediante la utilización de revelador Dektol, (Kodak) y fijador (Romek) adecuados para ese film.

Cuantificación de la fijación específica de radioligandos en autorradiogramas:

Los autorradiogramas se procesaron en un analizador de imágenes, MCID/II (versión 4.02 para entorno OS2). Mediante este programa se compararon las densidades ópticas de las imágenes del film con aquellas de estándares de tritio expuestos simultáneamente. De esta forma, las densidades ópticas de los autorradiogramas son convertidas a unidades de radioactividad por unidad de área, y finalmente a unidades de concentración.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE FIJACIÓN ESPECÍFICA:

A) Cálculos

Los resultados se obtienen del contador de centelleo líquido expresados en cuentas por minuto (cpm) y es necesario transformarlos a desintegraciones por minuto (dpm), teniendo en cuenta la eficiencia del conteo. Estos cálculos se hicieron a partir de una curva de eficiencia, construída con estándares de actividad específica conocida y contados en el mismo aparato. Conociendo la actividad específica de los radioligandos, se transforman las dpm en los fmoles correspondientes. Por último, los resultados se expresaron, en general, como fmoles de droga radioactiva unida por miligramo de proteína (fmol/mg de proteína), dado que la concentración de proteína en los ensayos era conocida. Estos cálculos descriptos se realizaron corrientemente utilizando planillas de cálculo en computadoras personales, como por ejemplo Lotus, Quattro Pro o Excel.

B) Ajuste de curvas

Dependiendo del tipo de ensayo de fijación específica de radioligandos, los puntos experimentales se ajustaron a ecuaciones que determinan los modelos usados comúnmente para explicar la posible fenomenología subyacente en los mismos. Las curvas correspondientes se generaron utilizando el programa GraphPad Prism (San Diego, USA; http://www.graphpad.com), que funciona bajo entorno Windows en computadoras personales. Este programa genera el mejor ajuste utilizando métodos numéricos, dada una ecuación determinada, y en el caso que sea necesario compara los ajustes a dos ecuaciones y determina el mejor, evaluando la suma de los errores y los grados de libertad de cada uno.

Curvas de saturación: en este caso el modelo de la ley de acción de masas determina el ajuste a una curva hiperbólica:

$$Y = \frac{B_{max} * X}{K_D + X}$$

Y representa la unión específica como función de la concentración del radioligando X. B_{max} es el número máximo de sitios de unión y K_D la constante de disociación aparente del radioligando.

La transformación de Scatchard (Scatchard, 1949) permite linealizar los datos de estos experimentos, ajustándose los mismos a regresiones lineales.

$$\frac{B}{F} = \frac{B}{K_D} + \frac{B_{max}}{K_D}$$

Curvas de inhibición: los modelos en estos casos predicen una forma de curva sigmoidea cuando se grafica la unión específica del radioligando como función del logaritmo de la concentración del inhibidor. El caso más simple corresponde a las curvas de competición, donde el inhibidor compite con el radioligando por una población homogénea de sitios, por ley de acción de masas:

$$Y = Piso + \frac{Techo - Piso}{1 + 10^{(X - \log IC_{50})}}$$

Y representa la unión específica del radioligando como función de la concentración del inhibidor *X*. *Techo* y *Piso* son los valores máximo y mínimo de *Y*, respectivamente. IC_{50} es la concentración de inhibidor correspondiente al punto de inflexión de la curva. De estas curvas de competición se puede calcular el valor de la constante de inhibición K_i, conociendo el valor de K_D del radioligando. Los valores de K_i se calcularon aplicando la corrección de Cheng-Prusoff para la concentración de radioligando, la cual asume una interacción competitiva entre el inhibidor y el ligando en cuestión (Cheng y Prusoff, 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{F}{K_D}}$$

El alejamiento de la ley de acción de masas lo describe la ecuación sigmoidea de pendiente variable (o de Hill):

$$Y = Piso + \frac{Techo - Piso}{1 + 10^{\frac{\log IC_{50} - X}{n_H}}}$$

Aquí aparece una nueva variable (n_H) llamada comúnmente "número de Hill" (considerado igual a 1 en las curvas de competición) que describe la pendiente de la curva y que podría reflejar multiplicidad de sitios de unión o bien fenómenos cooperativos.

Curvas de asociación: los experimentos cinéticos de asociación se describen como modelos de asociación exponencial, siendo el de una fase el más simple:

$$Y = Amplitud * e^{(-K*X)} + Piso$$

Y representa la unión específica del radioligando como función del tiempo *X*. *Amplitud* es la diferencia entre los valores máximo y mínimo de *Y*. *K* es la constante de tiempo del curso de la asociación, también denominada k_{+1}. *Piso* es el valor mínimo de *Y*, generalmente considerado igual a cero (para *X*=0).

Curvas de disociación: la modelización de decaimiento exponencial de una sola fase es usada para la descripción de estos ensayos cinéticos:

$$Y = Y_{max} * (1 - e^{(-K*X)})$$

Y representa la unión específica del radioligando como función del tiempo *X*. Y_{max} es el valor máximo de *Y* (para *X*=0). Al igual que en el modelo anterior, *K* es una constante de tiempo, denominada también k_{-1}. Tanto en este caso como en el anterior se puede definir un valor de $T_{1/2}$=0.69/*K*.

Comparación de los ajustes a dos ecuaciones: Algunas veces no se conoce de antemano cuál de dos ecuaciones es más apropiada para los datos experimentales. El software utilizado para la construcción de curvas es capaz de ajustar ambas ecuaciones

y comparar los resultados. En general, en el presente trabajo se compararon curvas de competición a un sitio de unión con curvas sigmoideas de pendiente variable, en los experimentos de inhibición; hipérbolas de saturación a un sitio con respecto a dos sitios de unión, en los experimentos de saturación, y curvas exponenciales simples con respecto a dobles, en los experimentos cinéticos.

La bondad de ajuste de un modelo se cuantifica como la suma de cuadrados, mientras que su complejidad (o sea número de variables) está implícita en los grados de libertad del ajuste. El test de "F" compara los ajustes a dos ecuaciones con diferentes grados de libertad y determina si el modelo más complicado ajusta significativamente mejor que el más simple. El estadístico F está determinado por la fórmula

$$F = \frac{\dfrac{(SC_1 - SC_2)}{SC_2}}{\dfrac{(GL_1 - GL_2)}{GL_2}}$$

SC_1 y SC_2 representan las sumas de cuadrados de los modelos 1 (más simple) y 2 (más complicado), mientras que GL_1 y GL_2 representan los respectivos grados de libertad, que dependen del número de variables de cada modelo.

EXPERIMENTOS FISIOLÓGICOS

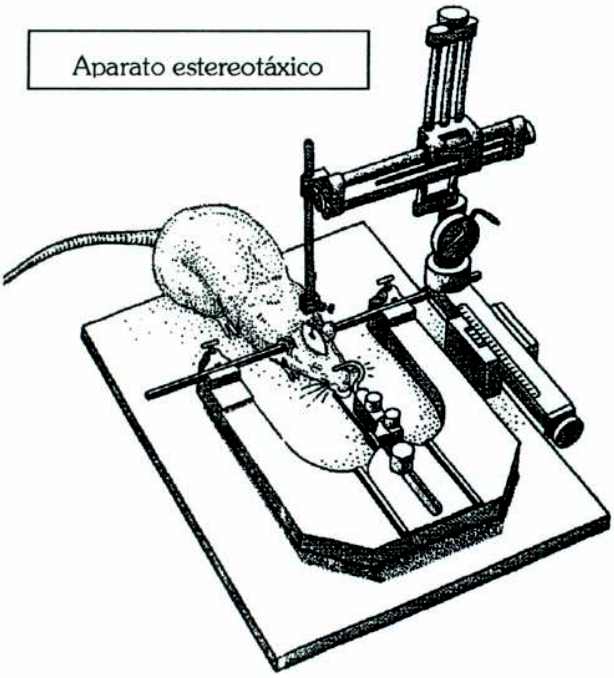
Captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas

Se realizan los mismos en una preparación de sinaptosomas, siguiendo el método de Blaustein (1975) y Lundy y col. (1991). Se disectan cortezas cerebrales o hipocampos de ratss; se los homogeiniza en sacarosa 0.32 M y se centrifuga 10 min a 1000 × g. Al sobrenadante se lo vuelve a centrifugar, esta vez 15 min a 40000 × g. Se resuspende el pellet resultante en un volumen adecuado de solución fisiológica con buffer HEPES (PSS) y se lo divide en alícuotas de 100 µl. Se agrega entonces la toxina o droga deseada y se incuba a 25°C durante 20 min bajo una atmósfera de O_2/CO_2 (95%:5%).

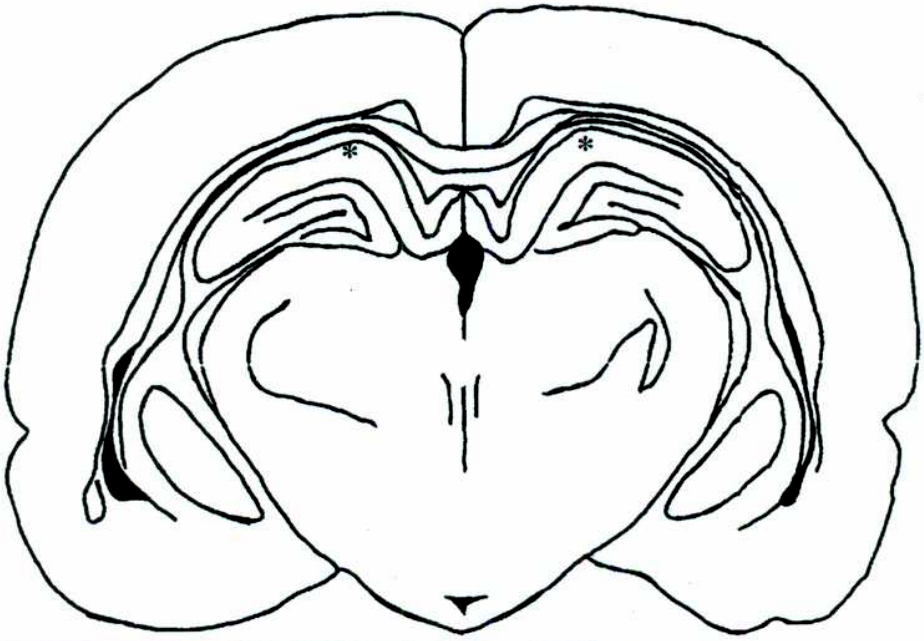
El ensayo de captación ("uptake") de $^{45}Ca^{2+}$ basal se comienza agregando 100 µl de solución PSS conteniendo 0.5 µCi de $^{45}Ca^{2+}$ y KCl 5 mM (solución "basal"), luego de 5 seg se agregan 3 ml de solución PSS sin Ca^{2+} y con EGTA 4 mM (solución "stopping"), y se filtra inmediatamente en aparato Millipore de vacío con filtros Whatman GF/B. Los filtros se lavan dos veces con 4 ml de solución PSS con 4 mM de Ca^{2+} (solución "washing"). Los filtros se secan en estufa y se mide la radioactividad retenida en cada uno de la misma forma que en los ensayos de fijación específica con radioligandos.

Paralelamente se realizan los ensayos de captación de $^{45}Ca^{2+}$ estimulado por KCl, agregando 100 µl de solución PSS con la misma actividad específica de $^{45}Ca^{2+}$, pero con 20, 30 ó 60 mM final de KCl (solución "estimulada"). Además se procesan tubos denominados "blancos", que contienen 100 µl de PSS sin sinaptosomas, tanto con solución "basal" como "estimulada". El procedimiento ulterior es el mismo que para los ensayos basales.

Entrenamiento de evitación inhibitoria



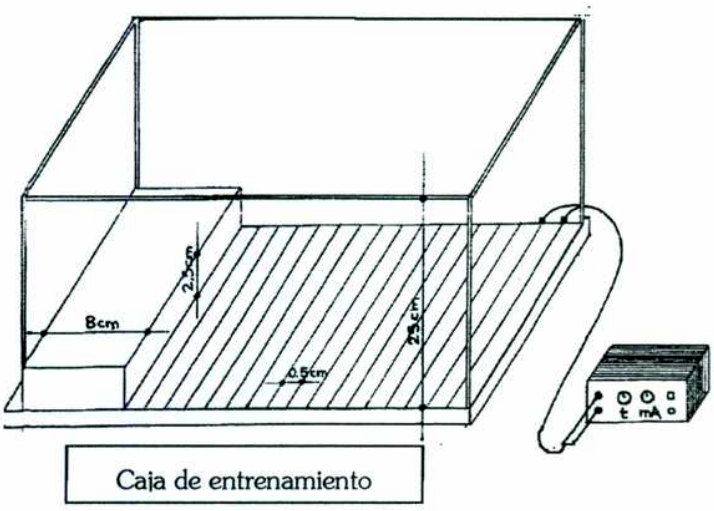
Ratas Wistar (220-280 g de peso) fueron implantadas bilateralmente, bajo anestesia de hidrato de cloral o tionenbutal (30 mg/kg, i.p.), con cánulas de la medida 27 dirigidas al hipocampo dorsal, utilizando un aparato estereotáxico. Las coordenadas, acorde con el atlas de Paxinos y Watson (1986, 1997), fueron: A, -4.3 mm del bregma; L, 3.0 mm de la línea media; V, 2.0 mm.



Corte frontal de cerebro de rata. Los asteriscos muestran las zonas de inyección.

Bregma -4.3 mm

Las ratas se entrenaron en una tarea de evitación inhibitoria "step-down" en una sola sesión, cinco a siete días luego de la cirugía. El aparato consiste en una caja de acrílico de 50 x 25 x 25 cm con un panel frontal de vidrio y un piso de barras paralelas de bronce, espaciadas en 0.5 cm. A la izquierda de la caja se colocó una plataforma de 2.5 cm de alto y 8 cm de ancho. En la sesión de entrenamiento, se colocó al animal sobre la plataforma con sus cuatro patas. Al bajar con sus cuatro patas de la plataforma, la rata recibió un choque eléctrico de 0.5 mA durante 2 seg, luego del cual se la retiró del aparato. La latencia del entrenamiento consistió en el tiempo en que el animal tardó en bajar sus cuatro patas desde la plataforma. En la sesión de test, la cual se realizó 24 h más tarde, no se suministró el choque eléctrico, y se tomó como medición de la retención de la tarea a la diferencia de las latencias entre la sesión de test y la de entrenamiento (con un techo de 180 seg).



Caja de entrenamiento

Inmediatamente luego de la sesión de entrenamiento (2-3 min luego de retirar la rata de la caja de evitación inhibitoria), el animal recibió una microinyección de 0.5 µl bilateralmente en el hipocampo dorsal de:

- vehículo (solución fisiológica)
- escopolamina (2 µg)
- oxotremorina (2 µg)
- MTx1 ó MTx2 (de 0.3 µg a 1.5 µg)
- oxotremorina (1 µg) más escopolamina (2 µg)
- MTx1 ó MTx2 más escopolamina

Estos animales se testearon 24 h más tarde para la latencia en bajar de la plataforma.

Los resultados, expresados como la mediana de la diferencia entre las latencias del test y el entrenamiento, se analizaron estadísticamente por el test no paramétrico de "U" de Mann-Whitney, de dos colas.

La localización de las cánulas e inyecciones se verificaron por histología clásica.

Íleo de cobayo

Se suspendieron pequeños segmentos de íleo (1.0-1.5 cm) en solución Krebs-Henseleit (NaCl 118.4 mM, KCl 4.7 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $NaHCO_3$ 25 mM y glucosa 11.1 mM) a 33°C y pH 7.3. La tensión de reposo fue alrededor de 1 g de peso, y las contracciones se registraron en forma isométrica. Se construyeron curvas dosis-respuesta a la acetilcolina o al carbacol; se agregaron MTx1 o MTx2 y las curvas dosis-respuesta de los agonistas se repitieron; luego se lavaron las toxinas y las curvas dosis-respuesta de los agonistas volvieron a repetirse.

En algunos experimentos, los segmentos de íleo fueron estimulados transmuralmente con electrodos bipolares a 0.05 Hz con trenes de 0.5 seg de pulsos de 0.5 mseg a 10 Hz. Se determinaron los efectos de adiciones acumulativas de MTx1 o MTx2.

Aurícula de cobayo

Se aislaron aurículas izquierdas y derechas con contracciones espontáneas y se colocaron separadamente en solución Krebs-Henseleit (NaCl 118.5 mM; KCl 4.7 mM; $MgSO_4$ 1.2 mM; KH_2PO_4 1.2 mM; $CaCl_2$ 2.5 mM; $NaHCO_3$ 25 mM; glucosa 11.1 mM). La temperatura del baño se mantuvo a 33°C y pH 7.3. Se aplicó una tensión de reposo de

1 g a la preparación. Se obtuvieron los efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos de la acetilcolina en ausencia y presencia de MTx1.

Conducto deferente de conejo

Se sacrificaron conejos New Zealand (2.0-2.5 kg) con sobredosis de tiopentona y se disectaron los conductos deferentes. Cada conducto se dividió en las porciones prostática y epididimal. Los dos tipos de preparación se suspendieron en baños para tejidos de 10 ml, con solución Krebs-Henseleit a 33°C y pH 7.3, con burbujeo de O_2/CO_2 (95%/5%). La tensión de reposo fue de 1 g. La solución contuvo $CaCl_2$ 1 mM para incrementar la sensibilidad de la preparación a los compuestos que actúan sobre los receptores muscarínicos M_1 (Dörje y col., 1991a, b). Se agregó también a la solución idazoxan (1 μM) para bloquear los receptores adrenérgicos α_2 presinápticos, en vez de yohimbina (Doxey y col., 1983). En la mayoría de los experimentos las toxinas MTx1 y MTx2 se agregaron acumulativamente. Las contracciones se obtuvieron por estimulación de campo a 0.05 Hz con trenes de 0.5 seg de pulsos de 0.5 mseg a 10 Hz.

Conducto deferente de rata

Se disectaron los conductos deferentes de ratas (250-400 g) sacrificadas por dislocación cervical. Se usó la porción central de cada tejido (alrededor de 2 cm). Las preparaciones se ensayaron en las mismas condiciones descriptas para el conducto deferente de conejo.

Resultados

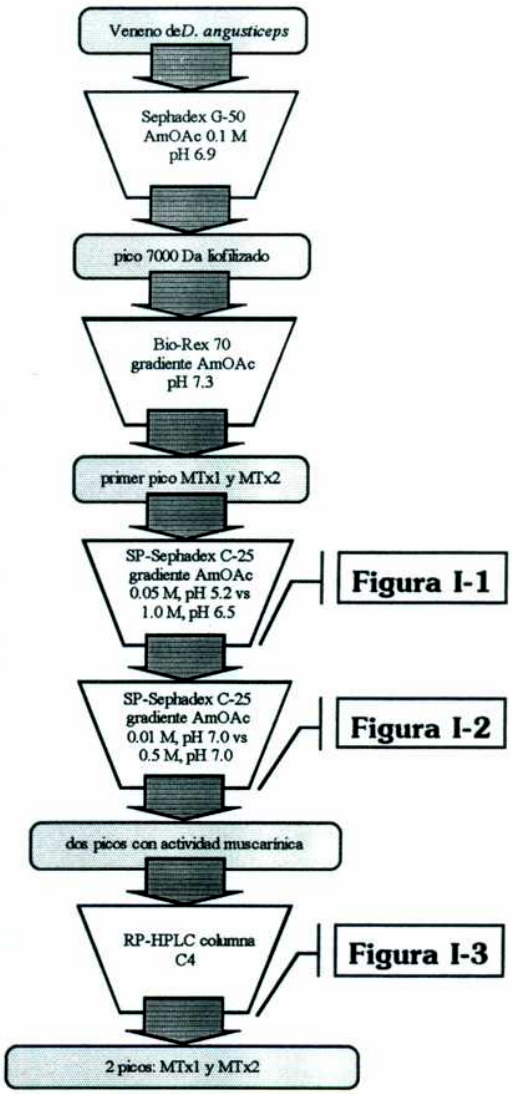
- **Capítulo I** Aislamiento y purificación de las toxinas
- **Capítulo II** Ensayos de fijación específica en receptores nativos
- **Capítulo III** Ensayos de fijación específica en receptores colinérgicos muscarínicos clonados
- **Capítulo IV** Experimentos fisiológicos
- **Capítulo V** Ensayos de fijación específica en cortes de cerebro de rata
- **Capítulo VI** Otras toxinas muscarínicas

Capítulo 1

Aislamiento y purificación de las toxinas

Este primer capítulo de resultados está dedicado a describir los procesos de purificación de las toxinas muscarínicas utilizadas por nosotros, del veneno de *Dendroaspis angusticeps*, a dilucidar la identidad de las mismas, así como a compararlas con otros péptidos con actividad semejante del mismo veneno.

La purificación de los péptidos se realizó en colaboración con el Dr. Carlos Cerveñansky y su grupo, del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo (Uruguay). El análisis de aminoácidos se realizó en colaboración con la Dra. Clara Peña del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, y la secuenciación del péptido se realizó en un secuenciador automático de fase gaseosa que se encuentra en el Laboratorio Nacional de Investigaciones y Servicios (LANAIS) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.



El descubrimiento de las primeras toxinas muscarínicas se remonta al año 1988 (Adem y col., 1988), cuando se vió que fracciones del veneno de *D. angusticeps* producían inhibición parcial de la fijación específica del antagonista muscarínico ^{3}H-QNB a membranas de cerebro de rata. La estrategia general usada por nosotros para el aislamiento de los

péptidos básicamente fue la misma, con algunas modificaciones (Jerusalinsky y col., 1989a,b; Jerusalinsky y col., 1992a,b).

Aislamiento y purificación de MTx1 y MTx2

Se usó una combinación de métodos cromatográficos, basados en diferentes principios, para aislar las toxinas MTx1 y MTx2 del veneno de *D. angusticeps*, y de otros venenos (ver sección Materiales y Métodos). Los principios consistieron en diferencias de tamaño (filtración en gel) y de carga (intercambio iónico). Los dos primeros pasos, la filtración en gel Sephadex G-50 y la cromatografía de intercambio catiónico Bio-Rex 70, son comunes a los del procedimiento de aislamiento de otras neurotoxinas no muscarínicas, como son las dendrotoxinas y fasciculinas, también presentes en el veneno de serpientes del género *Dendroaspis* (Harvey y Karlsson, 1980; Rodríguez-Ithurralde y col., 1983). El pico no retardado de la corrida en Bio-Rex 70, que contiene a las MTxs, fue sometido a dos pasos cromatográficos consecutivos en el intercambiador catiónico SP-Sephadex C-25, bajo las condiciones descriptas en Materiales y Métodos y en las Figuras I-1 y I-2. Se utilizaron gradientes menos pronunciados (Jerusalinsky y col., 1992a) que los usados en el procedimiento original (Adem y col., 1988), por lo que las variaciones de concentración del buffer eluyente se producen en un tiempo más prolongado, alcanzando la columna con un retardo mayor que en el procedimiento original. Esta modificación produjo una mejor separación de MTx1 y MTx2, así como una mayor pureza de los péptidos, como puede verse en el perfil de la corrida en fase reversa en la columna de HPLC (Figura I-3), separación que se basa en diferencias de hidrofobicidad. En las condiciones cromatográficas empleadas los tiempos de retención fueron 27.3 min para MTx1 y 12.5 min para MTx2 (Figura I-3).

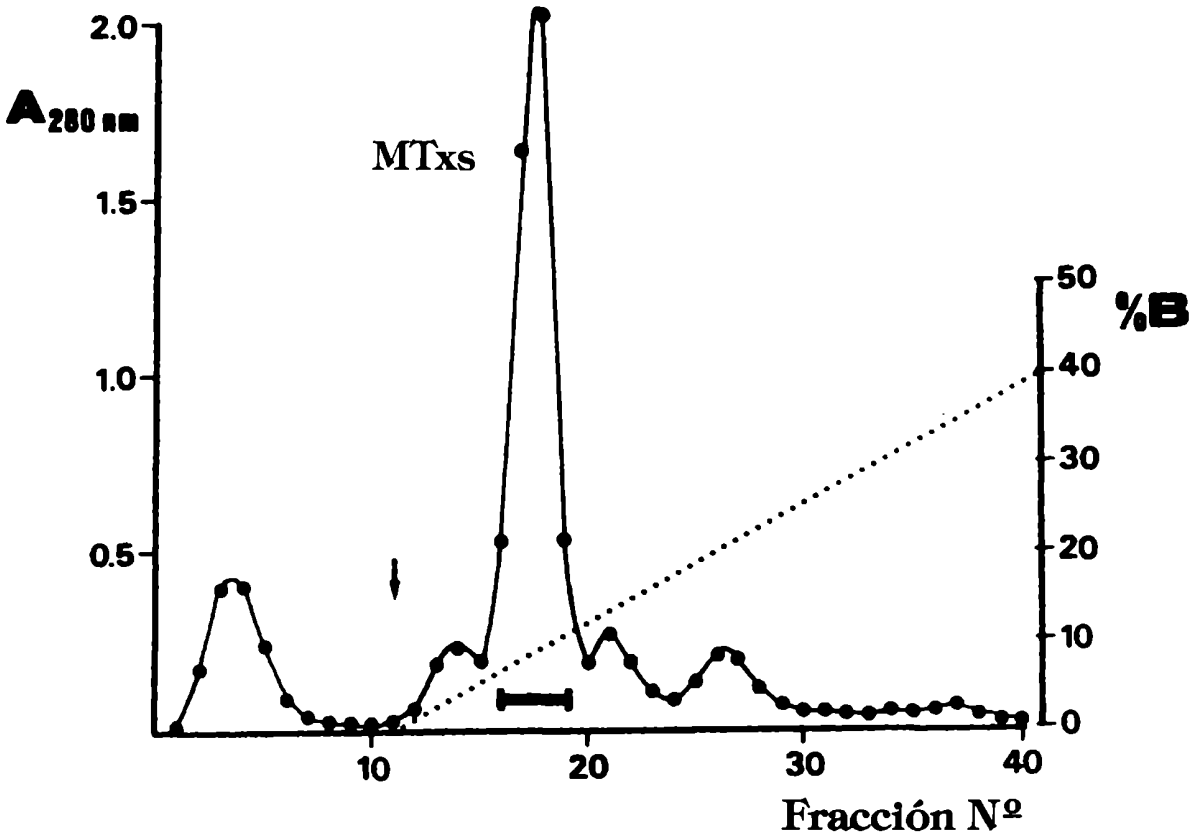


Figura I-1

Primer paso de cromatografía de intercambio iónico en SP Sephadex C-25 de la muestra del Bio Rex 70 (partiendo de 1.4 g de veneno). Dimensiones de la columna: 45 × 20 mm; volumen de las fracciones: 6.4 ml; tasa de flujo: 25.6 ml/h. El gel se equilibró en AmOAc 0.05 M, pH 5.20, la muestra liofilizada se disolvió en 15 ml del mismo buffer y se sembró en la columna. Se eluyó con un gradiente lineal (que comenzó donde indica la flecha y está indicado con la línea punteada) creado con un mezclador de gradientes Ultrograd, desde AmOAc 0.05 M, pH 5.20 (Buffer A), y AmOAc 1.00 M, pH 6.50 (Buffer B). La actividad muscarínica eluyó en el pico principal, y las fracciones se colectaron juntas de acuerdo a como indica la barra horizontal.

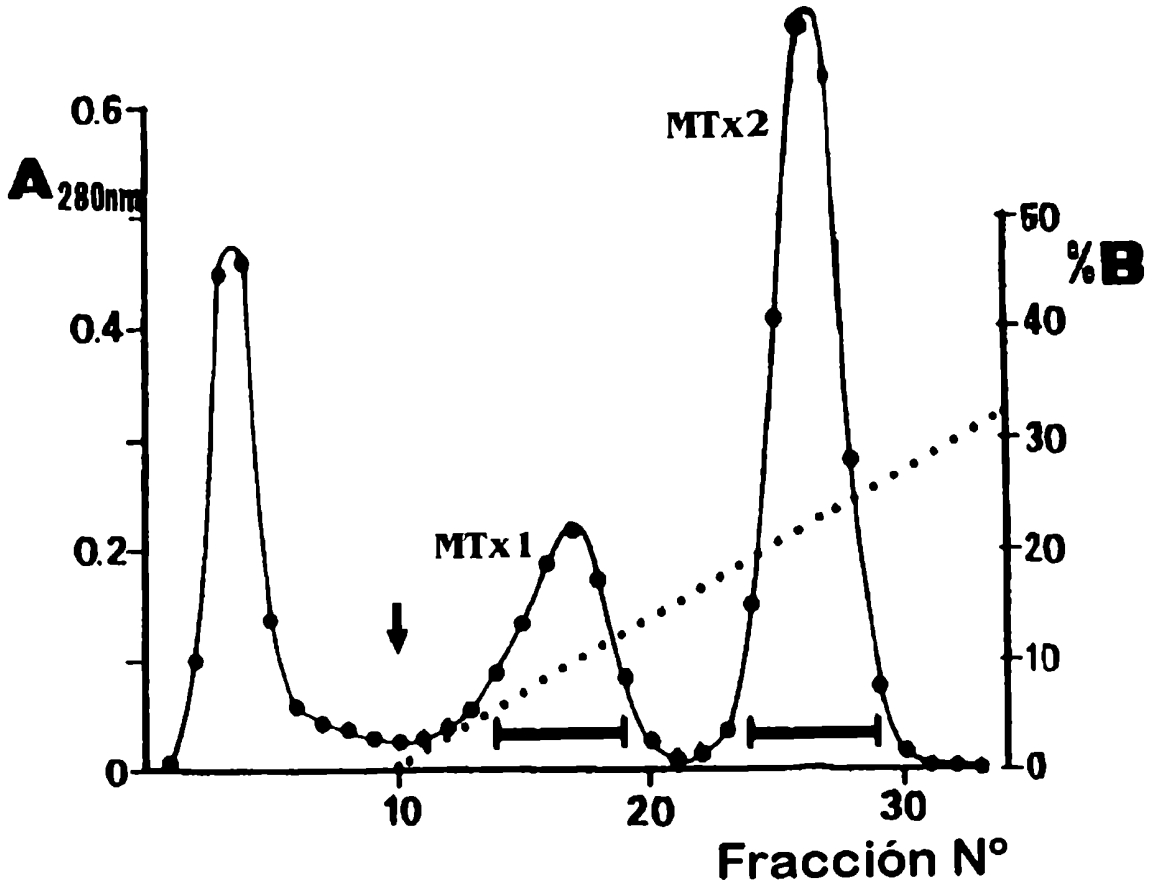


Figura I-2

Paso de cromatografía de intercambio iónico en SP Sephadex C-25 del pico principal de la Figura I-1. Dimensiones de la columna: 50 x 20 mm; volumen de las fracciones: 6.9 ml; flujo: 27.6 ml/h. El gel se equilibró en $Ar^{-}OAc$ 0.01 M, pH 7.00, la muestra liofilizada se disolvió en 12 ml del mismo buffer y se sembró en la columna. Se eluyó con un gradiente lineal (que comenzó donde indica la flecha y está indicado con la línea punteada) creado con un mezclador de gradientes Ultrograd, desde AmOAc 0.01 M, pH 7.00 (Buffer A), y AmOAc 0.50 M, pH 7.00 (Buffer B). Eluyeron dos picos proteicos con actividad muscarínica (denominados MTx1 y MTx2), los que fueron colectados de acuerdo a como indican las barras horizontales.

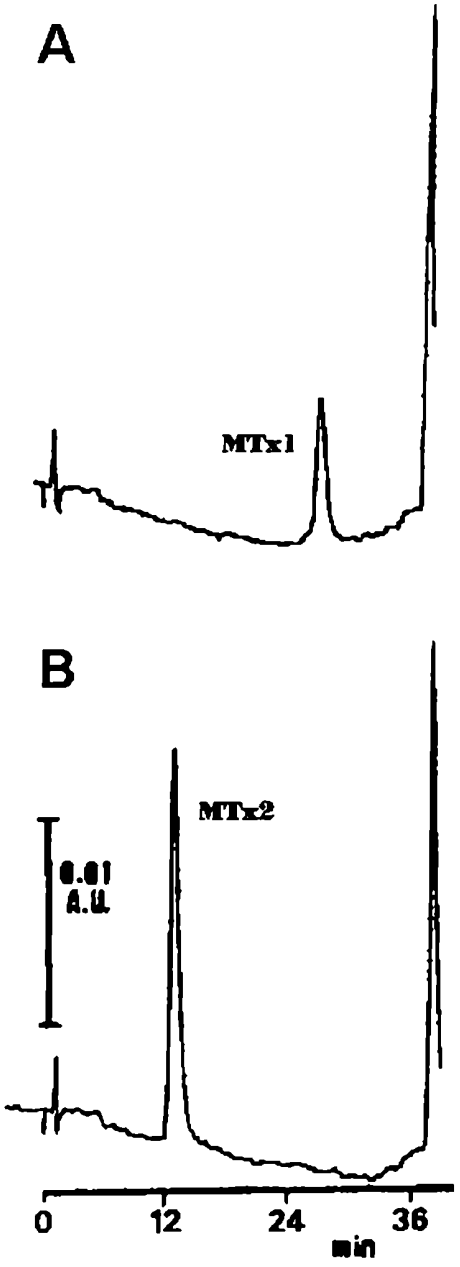


Figura 1-3
HPLC en fase reversa de las toxinas muscarínicas aisladas del veneno de *Dendroaspis angusticeps*. Se usó una columna BAKERBOND WP-Butyl (4.6 × 50 mm). Los eluyentes fueron: AmOAc 0.1 M, pH 6.9 (Buffer A) y AmOAc 0.1 M, pH 6.9 / 2-propanol 40% (Buffer B). El gradiente utilizado fue: 10% de B durante 2 min, 10 a 75% de B en 30 min, 75% de B durante 3 min, y 10% de B durante 5 min (paso de reequilibración). Flujo: 0.8 ml/min. Detección u.v. a 280 nm. Volumen de inyección: 50 µl.
A) MTx1, aprox. 15 µg.
B) MTx2, aprox. 60 µg.

Se obtuvieron alrededor de 10 mg de estas MTxs por cada gramo de veneno seco (alrededor del 1%), siendo la MTx2 la más abundante (70 a 80% del total de ambas). Por esta razón, varios ensayos bioquímicos se realizaron sólo con MTx2,

particularmente aquellos en los cuales fueron requeridas mayores cantidades del péptido.

Siguiendo el mismo procedimiento, se obtuvieron péptidos similares en venenos de otras serpientes: dos en *D. viridis* (DvMTx) y otro en *D. polylepis* (DpMTx). En el capítulo VI se detallarán las características de los de *D. viridis*.

Composición de aminoácidos y secuencia N-terminal

Se muestran en la Tabla I-A los resultados obtenidos por nuestro grupo sobre la composición aminoacídica de los péptidos nativos MTx1 y MTx2, y se compara con los obtenidos por los grupos de Karlsson, en Uppsala, y de Ménez, en París, los que las han secuenciado (Karlsson y col., 1991; Ducancel y col., 1991). El análisis de la secuencia de los primeros diez residuos del segmento N-terminal fue exactamente igual a la determinada por Karlsson y col. (1991) y Ducancel y col. (1991):

MTx2 N-terminal: LEU-THR-(CYS)-VAL-THR-THR-LYS-SER-ILE-GLY

TABLA I-A

Composición de aminoácidos de los dos polipéptidos: MTx1 y MTx2, de la fracción de 7000 Da del veneno de *Dendroaspis angusticeps*.

a: Relación molar (n=3).

b: Número de residuos del aminoácido obtenido por nosotros

c: Número de residuos del aminoácido obtenido por Karlsson y col. (1994) para MTx1, y por Karlsson y col. (1991) y Ducancel y col. (1991) para MTx2.

ND: no determinado.

	MTx1			MTx2		
Aminoácido	a	b	c	a	b	c
Asp (+Asn)	7.39	(7)	3	11.09	(11)	6
Thr	8.7	9	9	6.76	7	8
Ser	2.62	3	3	1.94	2	1
Glu (+Gln)	5.5	(5)	4	2.25	(2)	1
Gly	3.32	3	3	4.9	5	5
Ala	1.72	2	2	2.47	2	3
Val	3.04	3	3	5.17	5	5
Ile	5.0	5	5	3.2	3	4
Leu	2.14	2	2	1.19	1	1
Tyr	2.66	3	3	1.94	2	2
Phe	1.69	2	2	0.88	1	1
His	(0.28)	0	0	1.0	1	1
Lys	4.75	5	5	5.03	5	6
Arg	3.04	3	3	1.82	2	2
Trp	ND	—	2	ND	—	1
Half-cys	ND	—	8	ND	—	8
Pro	3.11	3	4	2.96	3	4
Asn	ND	—	4	ND	—	5
Gln	ND	—	1	ND	—	1
Número total de residuos		55	66		52	65

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO I

Los venenos de las serpientes denominadas mambas (género *Dendroaspis*) contienen varias neurotoxinas que son farmacológicamente distintas de las encontradas en los venenos de otras serpientes relacionadas. Además de las α-neurotoxinas clásicas, típicas de venenos de serpientes de la familia Elapidae (Chiappinelli, 1991; Adams y Swanson, 1996), los venenos de las mambas contienen toxinas inusuales como las dendrotoxinas (bloqueantes de ciertos canales de potasio; Harvey y Karlsson, 1980, 1982; Harvey y col., 1984; Anderson y Harvey, 1988), las fasciculinas (inhibidores específicos de la acetilcolinesterasa; Karlsson y col., 1984, 1985; Rodríguez-Ithurralde y col., 1983; Dajas y col., 1988) y toxinas bloqueantes de canales de calcio de tipo L, como la calciseptina (De Weille y col., 1991) y la calcicludina (Schweitz y col., 1994). En 1967, Welsh reportó que el veneno de la mamba verde oriental (*Dendroaspis angusticeps*) contenía acetilcolina y algunos estudios farmacológicos indicaron que el veneno poseía actividad colinomimética (Othman y col., 1973). Examinando los efectos del veneno y las subfracciones proteicas sobre la fijación específica de radioligandos muscarínicos a membranas de cerebro, Adem y col. (1988) hallaron que la fijación de ^{3}H-QNB (un radioligando muscarínico no selectivo) era parcialmente inhibida por el veneno de la mamba verde. Ellos aislaron entonces dos proteínas responsables de la mayor parte de esta actividad. Aunque no pudo determinarse actividad tóxica alguna de estas proteínas, fueron denominadas toxinas muscarínicas ("muscarinic toxins") 1 y 2 —MTx1 y MTx2—, según el orden de elución en el paso cromatográfico en el cual se separaban. En este mismo trabajo, ambas toxinas tuvieron potencias similares en el desplazamiento de ^{3}H-QNB, alcanzando una máxima inhibición de sólo aproximadamente un 50% en membranas de corteza cerebral de rata, sugiriendo la idea

de que las toxinas podrían ser selectivas por un subtipo de receptor muscarínico (Adem y col., 1988).

Nuestro grupo comenzó a trabajar en el fraccionamiento de este veneno en 1987, y los primeros reportes de resultados son de 1989 (Jerusalinsky y col., 1989a,b) y de 1991 (Jerusalinsky y col., 1991). Nosotros hemos encontrado resultados algo similares (Jerusalinsky y col., 1992a; capítulo II de este trabajo) con MTx1 y MTx2 en la fijación específica de ^{3}H-QNB a membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata y vaca. Discusiones profundizando estos aspectos están incluídas en el capítulo II.

El procedimiento de purificación de los péptidos se basa en principios como diferencia de cargas y tamaños. La obtención de picos estrechos y simétricos en el paso de RP-HPLC (que se basa en principios de hidrofobicidad) (Figura I-3) sugiere homogeneidad de las muestras. La reproducibilidad de los datos de determinación de aminoácidos de ambas MTxs y la secuencia N-terminal de MTx2, comparados a los obtenidos por Karlsson y col. (1991) y Ducancel y col. (1991), muestran que en este trabajo utilizamos péptidos de alta pureza.

La técnica original descripta para el aislamiento de MTx1 y MTx2 se modificó luego ligeramente, con los mismos pasos cromatográficos, pero con gradientes menos pronunciados, para mejorar la separación de los péptidos.

La estrategia para la purificación de estas toxinas ha sido utilizada por el grupo de Karlsson y otros laboratorios, incluído el nuestro, para aislar siete toxinas muscarínicas del veneno de la mamba verde oriental —MTx1-MT7— (Karlsson y col., 1994; Vandermeers y col., 1995; Jerusalinsky y col., 1997), y varias toxinas homólogas del veneno de la mamba negra —MTα, MTβ y MTγ— (Karlsson y col., 1994; Jolkkonen y col., 1995). Otras fracciones con actividad muscarínica se han aislado del veneno de la

mamba verde occidental (capítulo VI; Jerusalinsky y Harvey, 1994; Kornisiuk y col., 1996a,b).

En estudios paralelos, el grupo de Potter, en Miami, usó técnicas cromatográficas ligeramente distintas para aislar varias toxinas muscarínicas del veneno de *D. angusticeps*. Ellos han caracterizado la toxina m1 ("m1-toxin"), la cual presenta gran homología con la toxina MT7, hallada por el equipo de Karlsson (Max y col., 1993a,b, c), y también la toxina m4 ("m4-toxin"), que es idéntica a la toxina MT3 del grupo de Karlsson (Max y col., 1993d; Jolkkonen y col., 1994).

La primera toxina en ser secuenciada fue MTx2. Karlsson y col. (1991) determinaron la secuencia completa de MTx2 nativa por medio de métodos clásicos —bioquímicos—, mientras Ducancel y col. (1991) hicieron lo mismo por deducción a partir de la secuencia nucleotídica de cDNA aislado. La toxina posee 65 aminoácidos, con un peso fórmula de 7040 Da. Se aprecian grandes similitudes con un gran número de otras toxinas de venenos de serpiente, como las α-neurotoxinas curaremiméticas de cadena corta, las fasciculinas, las cardiotoxinas y las toxinas de tipo angusticeps ("angusticeps type") de venenos de mambas. En la Tabla I-B se muestran las secuencias conocidas de las toxinas muscarínicas de los venenos de serpientes del género *Dendroaspis*. En ella se puede ver que la homología entre las distintas toxinas muscarínicas se encuentra entre un 60% y un 98%. Algunas son isotoxinas, que difieren en 1, 2 ó 3 aminoácidos solamente.

TABLA I-B

Secuencias de las toxinas muscarínicas de los venenos de *Dendroaspis angusticeps* (D.a.) y *D. polylepis* (D.p.), comparadas con las de otras toxinas relacionadas.

MTx1: agonista m1=m4? (D.a.)
MTx2: agonista m1≥m4? (D.a.)
MT3: m4>m1 (D.a.), antagonista m4
MT4: agonista? m1=m4 (D.a.)
MT5: agonista? m1=m4
MT7: selectiva m1
MTα: m3, m4, m5>m1, m2 (D.p.)
MTß: m3, m4, m5 (D.p.)
m1-toxin: antagonista m1 (D.a.)
Dp CM3: sinergística (D.p.)
cardiotoxina: aumenta permeabilidad de membranas (*Naja sp.*)
Fasciculina1: inhibidor de la AChE (D.a.)

Se presentan sombreadas las áreas de mayor homología.

					5					10					15					20					25
MTx1	L	T	C	V	T	S	K	S	I	F	G	I	T	T	E	N	C	P	D	G	Q	N	L	C	F
MTx2	L	T	C	V	T	T	K	S	I	G	G	V	T	T	E	D	C	P	A	G	Q	N	V	C	F
MT3	L	T	C	V	T	K	N	T	I	F	G	I	T	T	E	N	C	P	A	G	Q	N	L	C	F
MT4	L	T	C	V	T	S	K	S	I	F	G	I	T	T	E	N	C	P	D	G	Q	N	L	C	F
MT5	L	T	C	V	T	S	K	S	I	F	G	I	T	T	E	D	C	P	D	G	Q	N	L	C	F
MT7	L	T	C	V	K	S	N	S	I	W	F	P	T	S	E	D	C	P	D	G	Q	N	L	C	F
MTα	L	T	C	V	T	S	K	S	I	F	G	I	T	T	E	N	C	P	D	G	Q	N	L	C	F
MTß	L	T	C	V	T	S	K	S	I	F	G	I	T	T	E	D	C	P	D	G	Q	N	L	C	F
m1-tox	L	T	C	V	K	S	N	S	I	W	F	P	T	S	E	D	C	P	D	G	Q	N	L	C	F
DpCM3	L	T	C	V	T	S	K	S	I	F	G	I	T	T	E	D	C	P	D	G	Q	N	L	C	F
cardiotx	L	K	C	N	-	-	K	L	I	P	L	A	Y	K	T	-	C	P	A	G	K	N	L	C	Y
FAS1	T	M	C	Y	S	H	T	T	T	S	R	A	I	L	T	N	C	-	-	G	E	N	S	C	Y

					30					35					40					45					50
MTx1	K	K	W	Y	Y	I	V	P	R	Y	S	D	I	T	W	G	C	A	A	T	C	P	K	P	T
MTx2	K	R	W	H	Y	V	T	P	K	N	Y	D	I	I	K	G	C	A	A	T	C	P	K	V	D
MT3	K	R	W	H	Y	V	I	P	R	Y	T	E	I	T	R	G	C	A	A	T	C	P	I	P	E
MT4	K	K	W	Y	Y	I	V	P	R	Y	S	D	I	T	W	G	C	A	A	T	C	P	K	P	T
MT5	K	R	R	H	Y	V	V	P	K	I	Y	D	I	T	R	G	C	V	A	T	C	P	K	P	E
MT7	K	R	W	Q	Y	I	S	P	R	M	Y	D	F	T	R	G	C	A	A	T	C	P	K	A	E
MTα	K	K	R	W	Y	L	N	H	R	Y	S	D	I	T	W	G	C	A	A	T	C	P	K	P	T
MTß	K	R	R	H	Y	V	V	P	K	I	Y	D	I	T	R	G	C	V	A	T	C	P	I	P	E
m1-tox	K	R	H	W	Y	I	S	P	R	M	Y	D	F	T	R	G	C	A	A	T	C	P	K	A	E
DpCM3	K	R	R	H	Y	V	V	P	K	I	Y	D	I	T	R	G	C	V	A	T	C	P	I	P	E
cardiotx	M	F	M	V	S	N	K	T	V	P	V	K	-	-	R	G	C	I	D	A	C	P	K	N	S
FAS1	R	K	S	R	R	H	P	P	K	M	V	-	L	G	R	G	C	-	G	-	C	P	P	G	D

					55					60					65		
MTx1	N	V	R	E	T	I	R	C	C	E	T	-	D	K	C	N	E
MTx2	N	N	-	D	P	I	R	C	C	G	T	-	D	K	C	N	D
MT3	N	Y	-	D	S	I	H	C	C	K	T	-	D	K	C	N	E
MT4	N	V	R	E	T	I	H	C	C	E	T	-	D	K	C	N	E
MT5	N	Y	-	D	S	I	H	C	C	K	T	-	D	K	C	N	E
MT7	Y	R	-	D	V	I	N	C	C	G	T	-	D	K	C	N	K
MTα	N	V	R	E	T	I	H	C	C	E	T	-	D	K	C	N	E
MTß	N	Y	-	D	S	I	H	C	C	K	T	-	D	K	C	N	E
m1-tox	Y	R	-	D	V	I	N	C	C	G	T	-	D	K	C	N	
DpCM3	N	Y	-	D	S	I	H	C	C	K	T	-	E	K	C	N	N
cardiotx	L	L	-	V	K	Y	V	C	C	N	T	-	D	R	C	N	
FAS1	D	Y	L	E	V	-	K	C	C	T	S	P	D	K	C	N	Y

A	Ala	G	Gly	M	Met	S	Ser
C	Cys	H	His	N	Asn	T	Thr
D	Asp	I	Ile	P	Pro	V	Val
E	Glu	K	Lys	Q	Gln	W	Trp
F	Phe	L	Leu	R	Arg	Y	Tyr

Las secuencias de las toxinas se compilaron de las siguientes fuentes:
MTx1: Karlsson y col. (1994); MTx2: Karlsson y col. (1991), Ducancel y col. (1991); MT3: Jolkkonen y col. (1994); MT4: Vandermeers y col. (1995); MTα: Jolkkonen y col. (1995); MTß: Jolkkonen y col. (1995); m1-toxin: Max y col. (1993a); DpCM3: Joubert (1985); cardiotoxina: Mebs y Claus (1991); FAS1: Le Du y col. (1992).

Las nueve toxinas muscarínicas poseen entre 64 y 66 aminoácidos, con pesos moleculares que rondan los 7000/7500 Da. Poseen 30 aminoácidos en común, y en 17 posiciones presentan una sola diferencia entre las nueve.

A pesar de que los puentes disulfuro, así como la estructura tridimensional, aún no fueron determinados experimentalmente más que para MTx2 (Ségalas y col., 1995a,b), los residuos de cisteína se encuentran en las posiciones correspondientes a los residuos en las α-neurotoxinas. Por consiguiente se puede predecir una estructura secundaria de las demás toxinas muscarínicas (ver Figura I-4), que correspondería a las conocidas como "three fingered toxins".

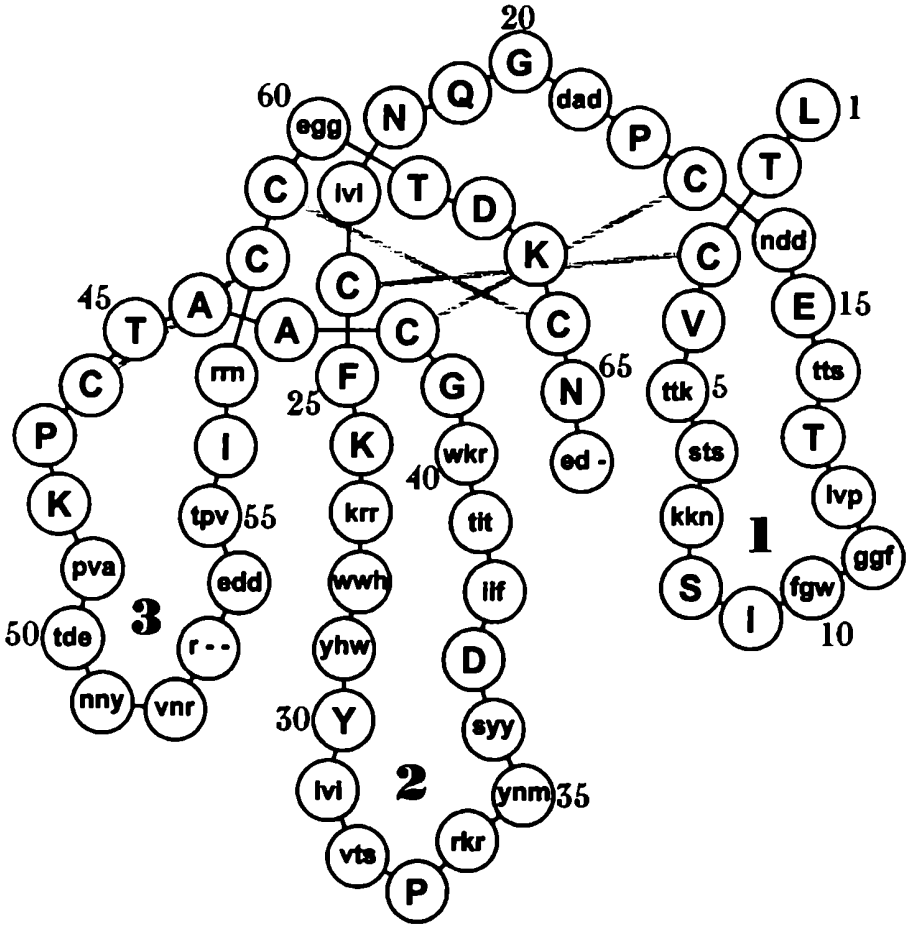


Figura I-4
Secuencia de aminoácidos de MTx1 (Jolkkonen y col., 1995), MTx2 (Ducancel y col., 1991; Karlsson y col., 1991) y toxina m1 (Max y col., 1993a). Cada círculo representa un residuo. La representación se construyó considerando la estructura tridimensional —"three-fingered" — de las cardiotoxinas (Rees y col., 1987), α-neurotoxinas (Low y col., 1976; Tsernoglu y Petsko, 1976), fasciculinas (Le Du y col., 1992), y confirmada para MTx2 (Ségalas y col., 1995a).

Además de los ocho residuos de cisteína conservados, las toxinas muscarínicas poseen Gly20, Gly41, Pro47 y Asn66, los que se encuentran conservados en todas las toxinas "three fingered".

Hay una alta homología entre las toxinas muscarínicas y las llamadas "toxinas sinergísticas", de venenos de mambas. Por ejemplo, MTß difiere en sólo dos posiciones de la toxina sinergística DpCM3 (Tabla I-B). Las toxinas sinergísticas han demostrado poseer muy baja toxicidad intrínseca, pero incrementan la letalidad de otros componentes de los venenos de mambas. Los mecanismos de acción de estas toxinas son desconocidos hasta el momento; además, no se sabe cómo contribuyen las toxinas muscarínicas a la letalidad de los venenos. Es posible que alteren el control de la liberación de neurotransmisor a través de una acción sobre receptores muscarínicos presinápticos, o bien podrían contribuir a la alteración cardiovascular causada por el veneno, actuando sobre receptores muscarínicos en los vasos sanguíneos. No obstante resulta difícil atribuir un rol particular funcional a las toxinas muscarínicas en los venenos de las mambas, dado que éstos contienen toxinas agonistas y antagonistas sobre los mismos subtipos de receptor muscarínico.

Observando detenidamente las secuencias conocidas de las toxinas muscarínicas (Tabla I-B), se ve que la parte central de las mismas (aminoácidos 25-40) es rica en aminoácidos hidrofóbicos (8-9 aminoácidos hidrofóbicos), zona correspondiente al "loop" 2 (Figura I-4). Las zonas equivalentes en las α-neurotoxinas y cardiotoxinas poseen un número menor de aminoácidos hidrofóbicos. Esta característica les permitiría a las toxinas muscarínicas penetrar en la membrana, de modo que alguno de los grupos catiónicos —Lys/Arg 27 y 34— interactuase con un residuo Asp esencial del sitio de unión del receptor (Wess, 1993a,b).

En la discusión general de este trabajo se ensayará una discusión más amplia sobre este tema, a la luz de los resultados que mostramos en los capítulos siguientes y de los datos bibliográficos disponibles hasta el momento.

Ensayos de fijación específica en receptores nativos

Con el objetivo de determinar la posible selectividad de las toxinas muscarínicas MTx1 y MTx2 por subtipos de receptores, se desarrollaron experimentos de fijación específica con radioligandos muscarínicos clásicos (ver sección Materiales y Métodos) en tejidos que presentan distintas proporciones de dichos subtipos de receptor.

Los tejidos utilizados fueron:

- corteza cerebral, que posee todos los subtipos farmacológicos, con especial abundancia del M_1 (Cortés y Palacios, 1986; Frey y Howland, 1992).
- tallo cerebral, con una mayor abundancia relativa del subtipo M_2 (Frey y Howland, 1992).
- hipocampo, con una composición similar a la corteza cerebral, con predominio de M_1 (Cortés y Palacios, 1986; Wall y col., 1991a,b; Frey y Howland, 1992; Yasuda y col., 1993).
- estriado, con alto contenido de los subtipos M_1 y M_4 (Mash y Potter, 1986; Frey y Howland, 1992).
- páncreas, que parece contener exclusivamente el subtipo M_3 (Waelbroeck y col., 1987a,b; 1989; 1991).
- conducto deferente de conejo, con los subtipos M_1, M_3 y M_3, (Eltze, 1988; Eltze y col., 1988; Dörje y col., 1991a,b; Grimm y col., 1994a).

Los experimentos se realizaron en preparaciones de membranas de acuerdo a lo descripto en la sección Materiales y Métodos. Las figuras que se muestran en este capítulo corresponden a experimentos representativos de entre 3 a 8 diferentes (con sus repeticiones por duplicado o triplicado), excepto las figuras II-5, II-19, II-22 y II-25, que corresponden a un ensayo.

Los resultados obtenidos de estos experimentos, como luego se verá, llevaron a una idea bastante fundada sobre la potencia y la selectividad de las toxinas por subtipos de receptores muscarínicos.

EXPERIMENTOS EN EQUILIBRIO

Ensayos de fijación específica de radioligandos en corteza y tallo cerebrales:

Experimentos de inhibición:

Los primeros ensayos de inhibición de la fijación específica de radioligandos muscarínicos por las toxinas muscarínicas MTx1 y MTx2, se realizaron en membranas sinaptosomales de corteza y de tallo cerebral, y en homogenatos de aurícula de corazón de rata. MTx1 y MTx2 inhibieron la fijación específica de los antagonistas no selectivos ^{3}H-QNB y ^{3}H-NMS a membranas de corteza cerebral en más de un 50% (Figuras II-1 y II-2); mientras que en membranas de tallo cerebral la inhibición alcanzó aproximadamente sólo un 35% (Figura II-3). Es necesario recordar que estos dos radioligandos no discriminan subtipos de receptor muscarínico, sino que reconocen a todos por igual (ver Introducción).

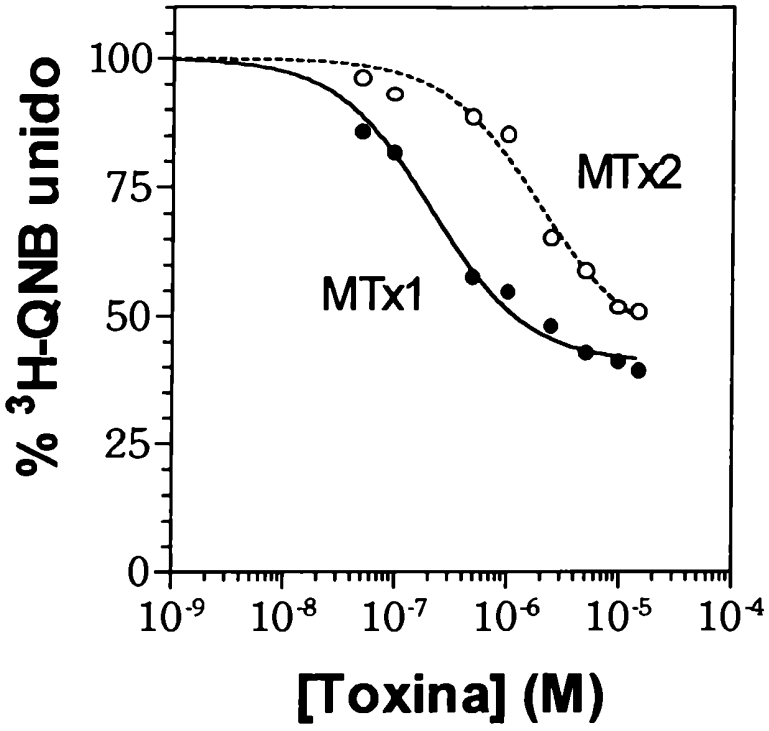


Figura II-1.
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-QNB por MTx1 y MTx2 en membranas de corteza cerebral de rata. Los valores de K_i fueron 49 nM para MTx1 y 450 nM para MTx2, con pisos de 40% y 42%, respectivamente. Los números de Hill fueron, respectivamente, 0.80 y 0.98, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas de pendiente variable.

Figura II-2.
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 y MTx2 en membranas de corteza cerebral de rata. Los valores de K_i fueron 78 nM para MTx1 y 484 nM para MTx2, con pisos de 25% y 44%, respectivamente. Los números de Hill fueron 0.95 y 1.12, respectivamente, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas de pendiente variable.

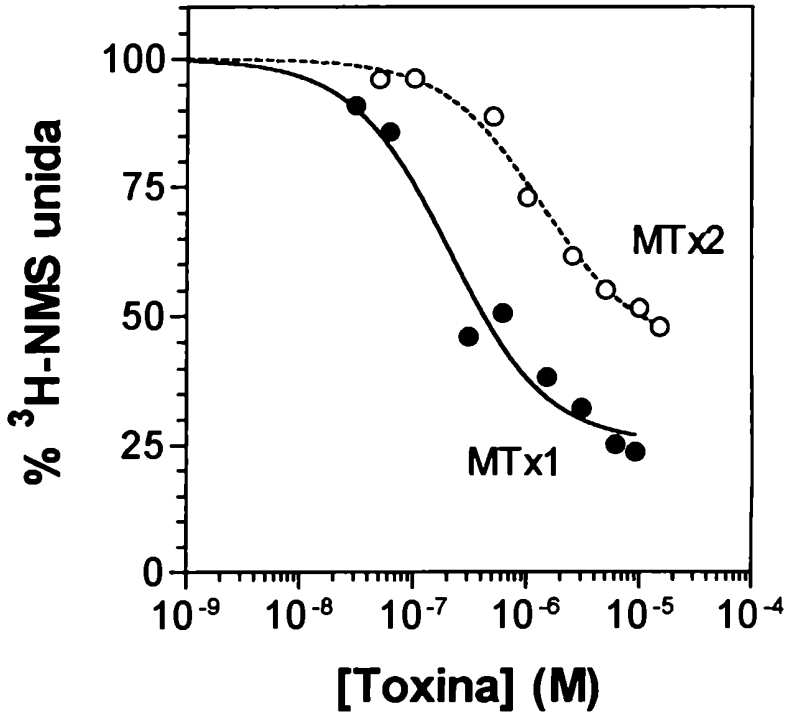
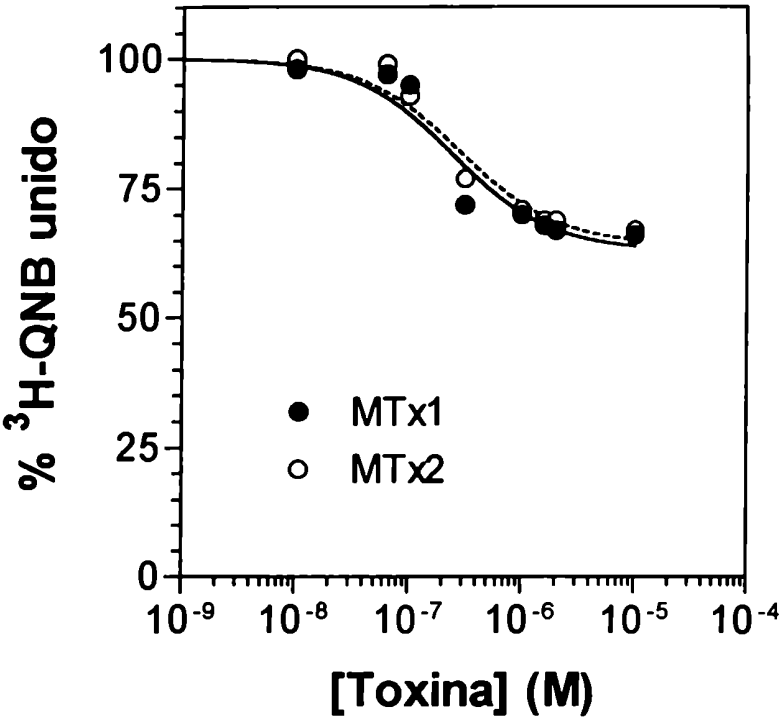


Figura II-3.
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-QNB por MTx1 y MTx2 en membranas de tallo cerebral de rata. Los valores de K_i fueron 125 nM para MTx1 y 144 nM para MTx2, con pisos de 63% y 64%, respectivamente.
Los números de Hill fueron 2.85 y 2.06, respectivamente, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas de pendiente variable.



Al analizar estos resultados se debe tener en cuenta que el receptor M_1, en el tallo cerebral, se encuentra en una concentración y proporción relativa menores de los que se encuentra en la corteza cerebral (Frey y Howland, 1992).

Las constantes de inhibición aparentes (K_i) para los ensayos de unión de ^{3}H-QNB vs MTx1 y ^{3}H-QNB vs MTx2 fueron de 49 y 450 nM, respectivamente, en membranas de corteza cerebral. En los experimentos con ^{3}H-NMS los valores fueron comparables, siendo las K_is 78 y 484 nM, para MTx1 y MTx2, respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, y considerando que los antagonistas ^{3}H-QNB y ^{3}H-NMS se unen sin discriminación a todos los subtipos de receptores muscarínicos, se hizo necesario ensayar la fijación específica de algún radioligando más selectivo, como es el caso del antagonista ^{3}H-pirenzepina (^{3}H-PZ), que posee una afinidad mayor por el subtipo farmacológico M_1, respecto de los demás (Hammer y Giachetti, 1982). En las condiciones de estos experimentos (es decir, en el

rango de concentraciones utilizadas), los sitios específicos para ^{3}H-PZ en membranas de corteza cerebral fueron aproximadamente la mitad del número total para ^{3}H-QNB o ^{3}H-NMS, lo cual es coherente con la proporción reportada del subtipo de receptor M_1 en corteza cerebral (Cortés y Palacios, 1986). Tanto MTx1 como MTx2 inhibieron alrededor de un 80-90% de la unión específica de ^{3}H-PZ (Figura II-4); en este caso, la K_i para MTx1 fue 11 nM y 244 nM para MTx2 (aplicando la corrección de Cheng-Prusoff, 1973). Cuando se analizan los resultados de acuerdo al modelo de curva sigmoidea con pendiente variable, los números de Hill ajustados corresponden a 0.30 y 1.54 (ver métodos). Estos valores, dados sus desvíos del valor unitario, nos llevan a pensar en algún tipo de interacción distinta, que no siga la ley de acción de masas, o bien en una composición más compleja de los RAChMs a los cuales se une ^{3}H-PZ.

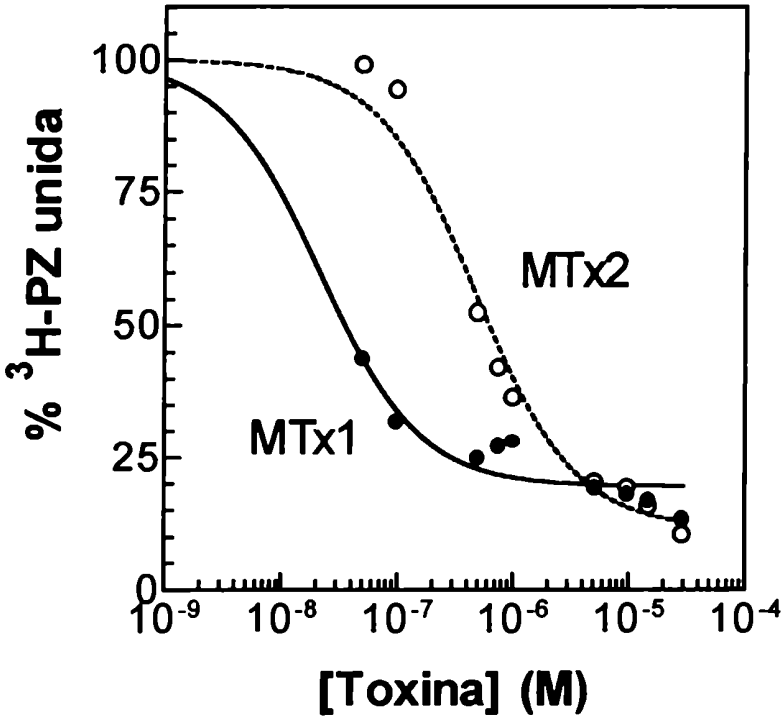


Figura II-4.
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-PZ por MTx1 y MTx2 en membranas de tallo cerebral de rata. Los valores de K_i fueron 11 nM para MTx1 y 244 nM para MTx2, con pisos de 19% y 11%, respectivamente.
Los números de Hill fueron 0.30 y 1.54, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas con pendiente variable.

Como ligando parcialmente selectivo por el subtipo farmacológico M_2 de receptor muscarínico, se utilizó ^{3}H-AF-DX 384 en membranas de corteza cerebral. La Figura II-5 muestra una curva de inhibición de la unión específica de este radioligando por MTx1 a membranas de corteza cerebral.

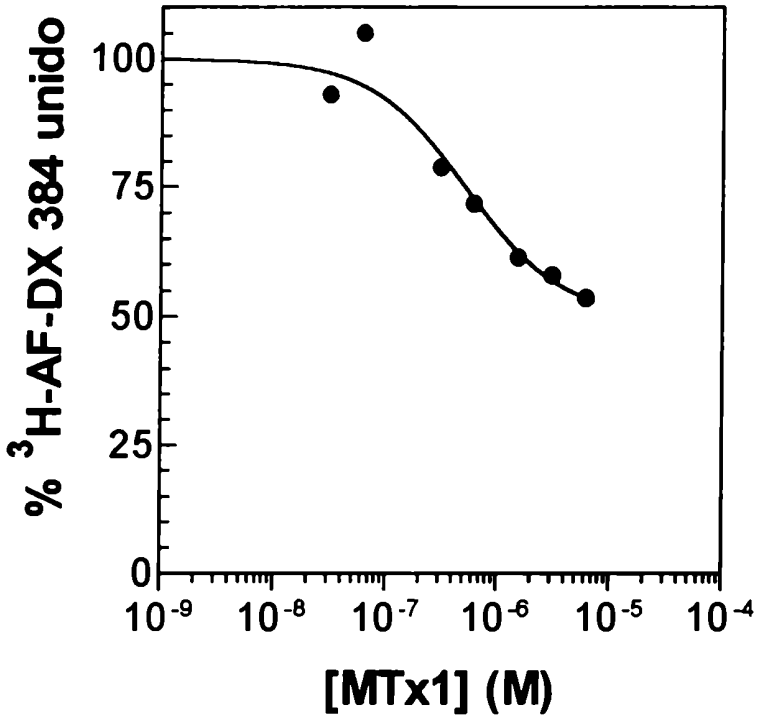


Figura II-5
Curva de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-AF-DX 384 por MTx1 en membranas de corteza cerebral de rata. El valor de K_i fue 228 nM, con un piso de 49%. El número de Hill fue 1.48, cuando se ajustó a una curva sigmoidea de pendiente variable.

Como vemos, MTx1 fue capaz de inhibir en forma parcial la fijación de este radioligando supuestamente selectivo para los receptores muscarínicos M_2. Como también ha sido reportado por Karlsson y col. (1994), es posible que este radioligando estuviera siendo desplazado de otros subtipos de receptor, como son M_1 y M_4, a los que también se uniría (Karlsson y col., 1994; Jolkkonen y col., 1995a).

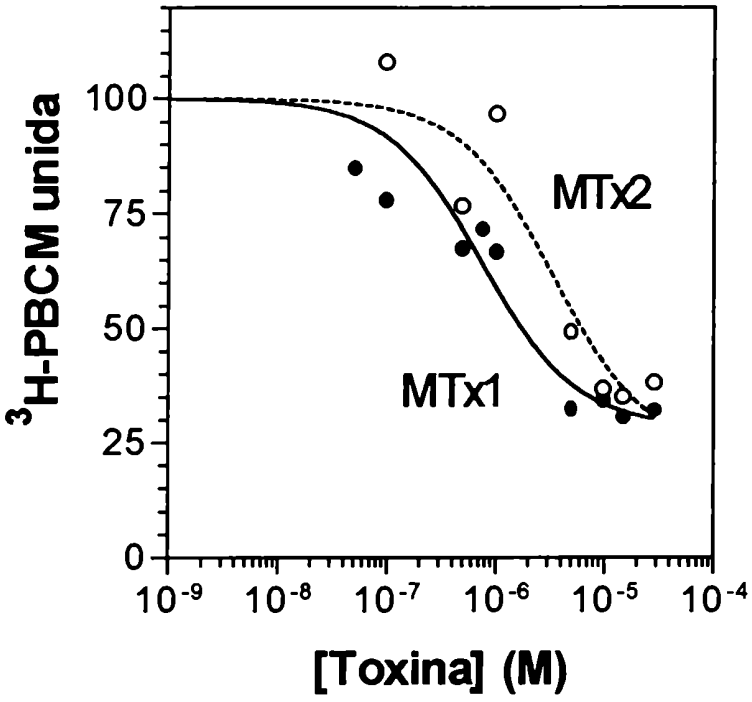


Figura II-6
Curva de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-PBCM por MTx1 y MTx2 en membranas de corteza cerebral de rata. Los valores de K_i fueron 390 nM y 670 nM, con pisos de 28% y 22%, reszpectivamente. Los números de Hill fueron 0.53 y 1.64, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas con pendiente variable.

En la Figura II-6 se observa la inhibición de la fijación de ^{3}H-PBCM en membranas de corteza cerebral de rata, por MTx1 y MTx2. Este radioligando se une irreversiblemente a todos los subtipos de receptor muscarínico. Nuevamente puede verse la mayor afinidad de MTx1 sobre MTx2 en la inhibición de este radioligando.

También se analizó la unión específica del agonista ^{3}H-Oxo-M a membranas de corteza cerebral (Figura II-7). Se observó una inhibición máxima de un 77% a un 85% en presencia de MTx1 o MTx2. La K_i aparente fue 137 nM para MTx1 y 105 nM para MTx2.

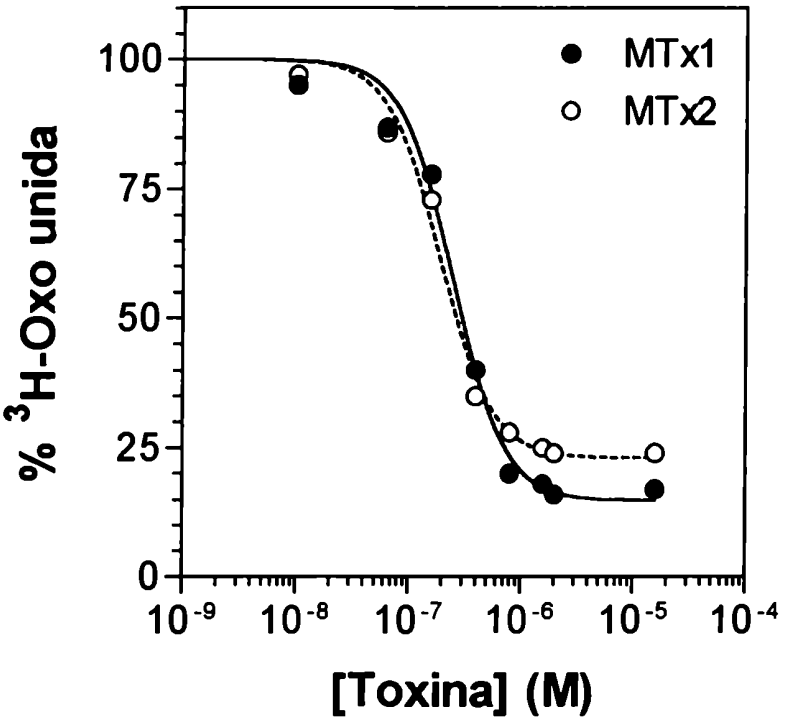


Figura II-7
Curvas de inhibición de la fijación específica del agonista ^{3}H-Oxo por MTx1 y MTx2 en membranas de corteza cerebral de rata. Los valores de K_i fueron 137 nM para MTx1 y 105 nM para MTx2, con pisos de 15% y 23%, respectivamente. Los números de Hill fueron 1.87 en ambos casos, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas de pendiente variable.

Con el objetivo de evaluar la especificidad de la acción de las toxinas sobre los receptores colinérgicos muscarínicos, MTx1 y MTx2 se ensayaron en la fijación de otros ligandos específicos para otros sistemas de neurotransmisión. La unión específica de ^{3}H-flunitrazepam —ligando benzodiazepínico—, como la de ^{3}H-AMPA —ligando glutamatérgico selectivo para receptores no-NMDA— o la de ^{3}H-muscimol —agonista $GABA_A$— no fueron significativamente alteradas por 1 ó 5 µM de MTx1 o MTx2.

También se ensayaron las toxinas en presencia de ^{125}I-bungarotoxina, ligando específico para receptores colinérgicos nicotínicos "no neuronales". En este caso se observó hasta un 22% de inhibición de la fijación específica de ^{125}I-bungarotoxina por 5 µM de MTx1. Sin embargo, MTx1 1 µM no produjo reducción significativa de la unión.

Sorprendentemente, aunque algo previsible (ver capítulo IV), las toxinas inhibieron la unión de ^{3}H-prazosin —ligando α-adrenérgico— (Cavero y Roach, 1980; Dashwood, 1983; Morrow y Creese, 1986) a membranas sinaptosomales de corteza

cerebral de rata (Figura II-8 y II-9). Los valores de K_i para MTx1 y MTx2 fueron de 292 y 727 nM, respectivamente.

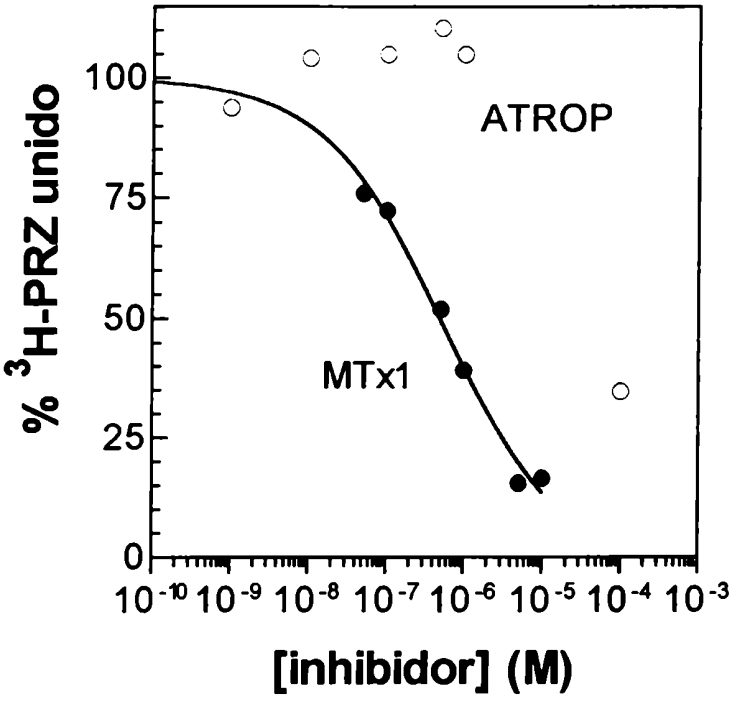
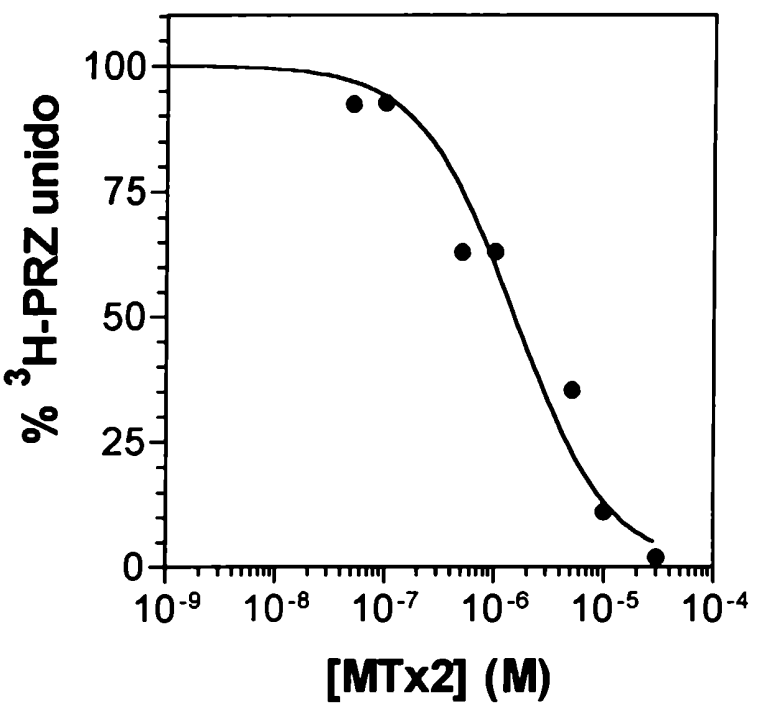


Figura II-8
Curvas de inhibición de la fijación específica del antagonista α-adrenérgico ^{3}H-prazosin por MTx1 en membranas de corteza cerebral de rata. El valor de K_i fue 292 nM para MTx1, con un piso de 4%.
El número de Hill fue 0.55, cuando se ajustó a una curva sigmoidea con pendiente variable. Con el propósito de comparación, se muestran los resultados obtenidos con el antagonista muscarínico clásico atropina.

Figura II-9
Curvas de inhibición de la fijación específica del antagonista α-adrenérgico ^{3}H-prazosin por MTx2 en membranas de corteza cerebral de rata. El valor de K_i fue 727 nM para MTx2, con un piso de 0%.
El número de Hill fue 0.55, cuando se ajustó a una curva sigmoidea con pendiente variable.



Experimentos de saturación:

Con el objetivo de estudiar el tipo de inhibición que ocurre en presencia de las toxinas, se llevaron a cabo ensayos de saturación con los radioligandos muscarínicos. En estos experimentos, se pueden determinar posibles variaciones de distintos parámetros de interés, de manera de evaluar el mecanismo por el que actúa el inhibidor. Se estimaron la constante de disociación aparente (K_D) y el número máximo de sitios (B_{max}) para cada radioligando, de acuerdo con las ecuaciones descriptas en la sección Materiales y Métodos, utilizando el programa para computadora personal (PC) GraphPad Prism (ver el capítulo Materiales y Métodos).

Como se mencionó anteriormente, la corteza cerebral expresa la totalidad de los subtipos de receptores muscarínicos, aunque el subtipo M_1 es el más abundante (Cortés y Palacios, 1986; Frey y Howland, 1992).

Los experimentos de saturación con ^{3}H-NMS, ^{3}H-QNB, ^{3}H-PZ y ^{3}H-Oxo-M, en presencia de las toxinas (entre 0.5 y 4 μM) en membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata, mostraron un incremento en el valor de K_D, sin cambios significativos en el de B_{max} (Figuras II-10, II-11, II-12 y Tabla II-A).

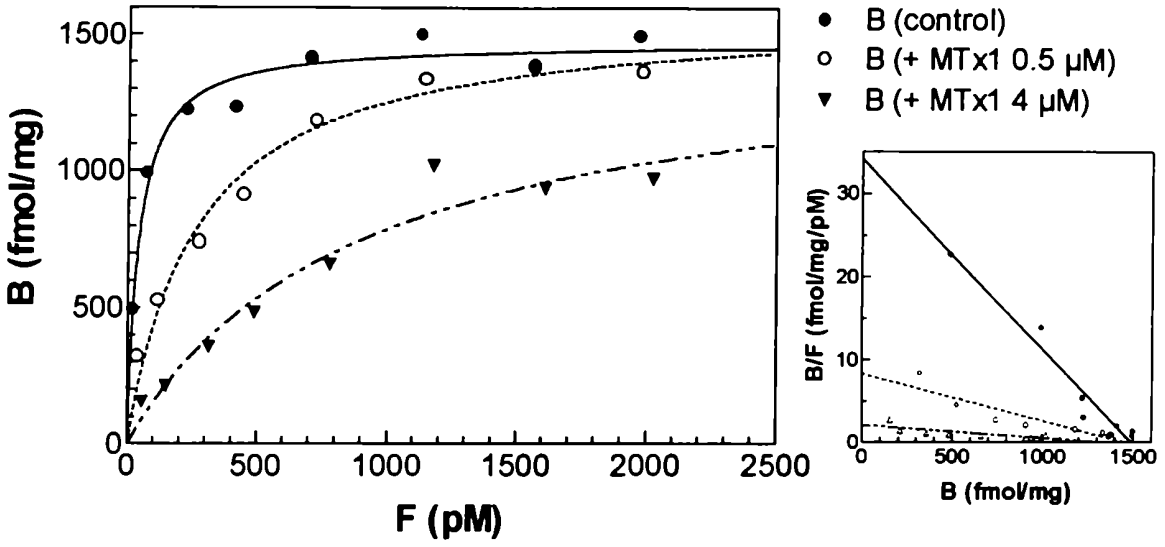


Figura II-10
Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-NMS en membranas de corteza cerebral de rata en ausencia y presencia de MTx1 (0.5 ó 4 µM). Los valores de K_D fueron 41 pM en ausencia de MTx1 y 265 pM en presencia de MTx1 0.5 µM y 880 pM con MTx1 4 µM . Los valores de B_{max} fueron 1.473, 1.584 y 1.484 pmol/mg, respectivamente.

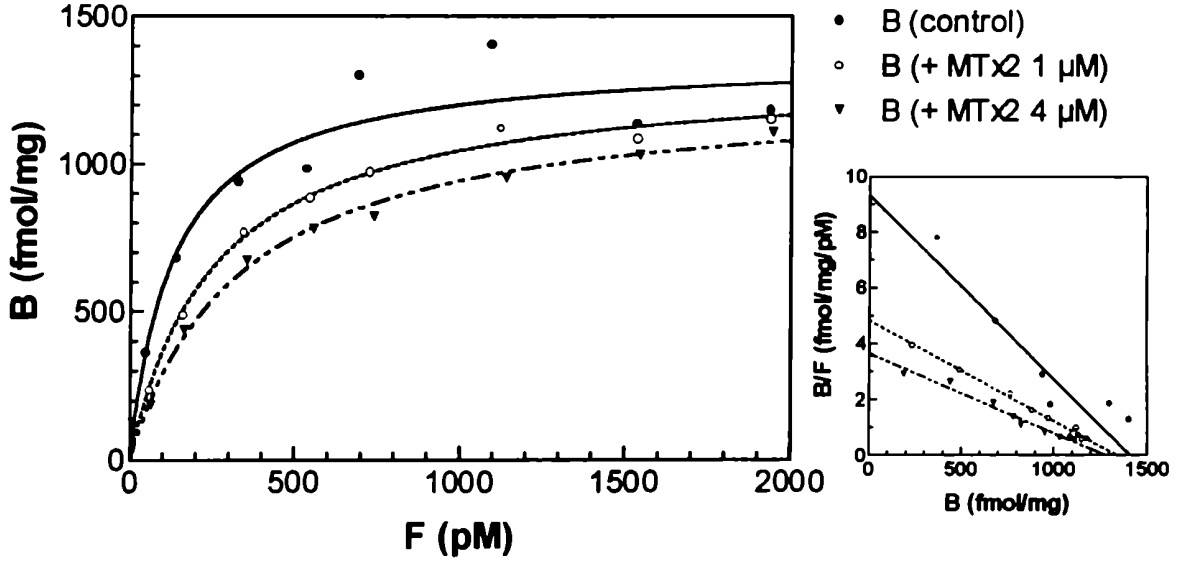


Figura II-11
Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-NMS en membranas de corteza cerebral de rata en ausencia y presencia de MTx2 (1 ó 4 µM). Los valores de K_D fueron 132 pM en ausencia de MTx2 y 259 pM en presencia de MTx2 1 µM y 334 pM con MTx2 4 µM . Los valores de B_{max} fueron 1.361, 1.317 y 1.258 pmol/mg, respectivamente.

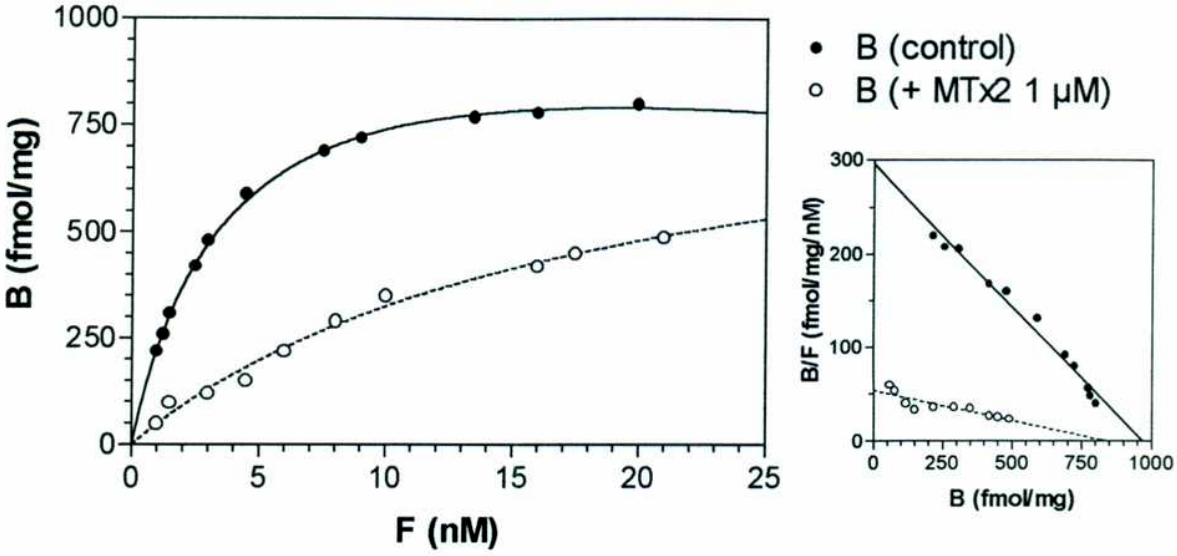


Figura II-12

Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-PZ en membranas de corteza cerebral de rata en ausencia y presencia de MTx2 1 μM). Los valores de K_D fueron 3 nM en ausencia de MTx2 y 18 nM en presencia de MTx2 1 μM. Los valores de B_{max} fueron 940 y 920 fmol/mg, respectivamente. A la derecha se muestran los gráficos de Scatchard correspondientes.

TABLA II-A

Efecto de MTx2 sobre el número máximo de sitios (B_{max}) y la constante de disociación aparente (K_D) de la unión específica de ^{3}H-QNB, ^{3}H-NMS, ^{3}H-PZ y ^{3}H-Oxo-M a membranas de corteza cerebral de rata.

Ligando	B_{max} (fmol/mg)	K_D (nM)
^{3}H-QNB	1740 ± 120	0.129 ± 0.052
^{3}H-QNB + MTx2 1 μM	1560 ± 170	0.998 ± 0.136*
^{3}H-PZ	1035 ± 108	2.051 ± 0.322
^{3}H-PZ + MTx2 1 μM	952 ± 98	10.129 ± 0.574*
^{3}H-Oxo-M	320 ± 25	1.895 ± 0.540
^{3}H-Oxo-M + MTx2 1 μM	260 ± 18	6.525 ± 1.082*

B_{max} y K_D expresadas como media ± e.s.m. n = 4-6.

*Significativamente diferente del respectivo control, sin MTx2 ($P<0.05$). Test 't' de Student.

Experimentos de inhibición:

El hipocampo presenta abundante proporción de los subtipos M_1 y M_4 de receptor muscarínico (Wall y col., 1991a,b; Yasuda y col., 1993). Además, la elección de esta estructura cerebral para la realización de estos experimentos resultaba particularmente interesante, dado que las toxinas MTx1 y MTx2 inyectadas en el hipocampo, se comportaron como agonistas muscarínicos en un paradigma de aprendizaje de evitación inhibitoria (ver el capítulo IV).

Las curvas de inhibición de la unión de ^{3}H-NMS en membranas sinaptosomales de hipocampo por MTx1 y MTx2, se ven en la Figura II-13.

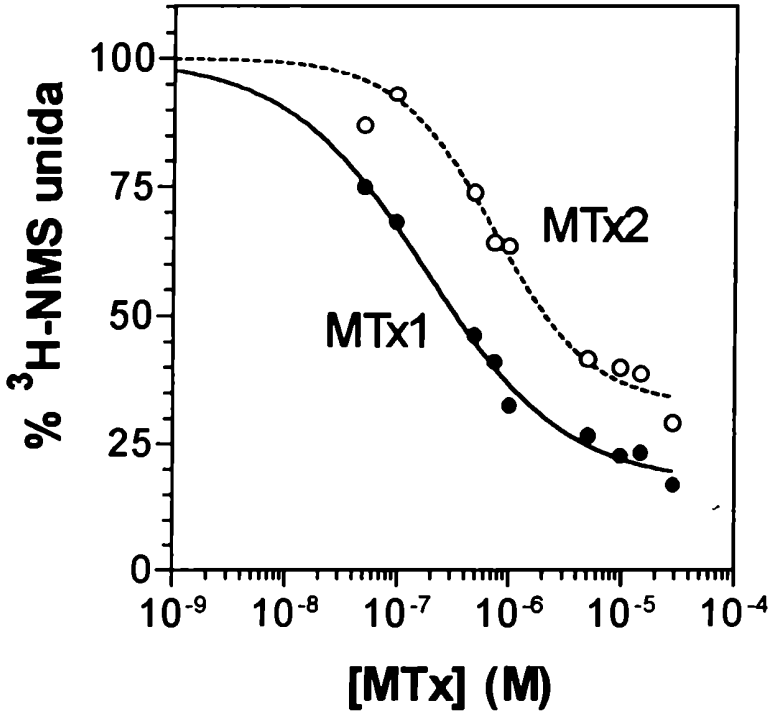


Figura II-13
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 y MTx2 en membranas de hipocampo de rata. Los valores de K_i fueron 41 nM para MTx1 y 194 nM para MTx2, con pisos de 17% y 33%, respectivamente.
Los números de Hill fueron 0.68 para MTx1 y 0.70 para MTx2, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas con pendiente variable.

MTx1 y MTx2 se comportaron en forma semejante a lo visto en corteza cerebral. Comparando la curva de MTx1, resulta ser bastante semejante a la de corteza, mientras que con MTx2 se obtiene un piso algo menor. Si se asume que estarían desplazando la fijación de ^{3}H-NMS principalmente de los subtipos M_1 y M_4 (ver capítulo III de resultados), la diferencia vista con MTx2 podría deberse a una proporción distinta de estas subtipos en hipocampo, respecto a la de corteza.

Ensayos de fijación específica de radioligandos en membranas de estriado

Experimentos de inhibición:

El estriado de rata es rico en el subtipo M_4 de receptor muscarínico (Boulay y col., 1996). Consideramos interesante estudiar la inhibición por las toxinas muscarínicas en esta estructura cerebral, debido a la diferencia en cuanto a la composición relativa en subtipos farmacológicos del receptor comparada con otras regiones (por ejemplo, corteza e hipocampo cerebrales); por otro lado, el estriado es una estructura singular en cuanto a su organización neuronal —posee interneuronas colinérgicas— y en cuanto a su fisiología —interviene fundamentalmente en el control del movimiento—.

En la Figura II-14 vemos las curvas de inhibición de la unión específica de ^{3}H-NMS en membranas de estriado de rata por las toxinas MTx1 y MTx2.

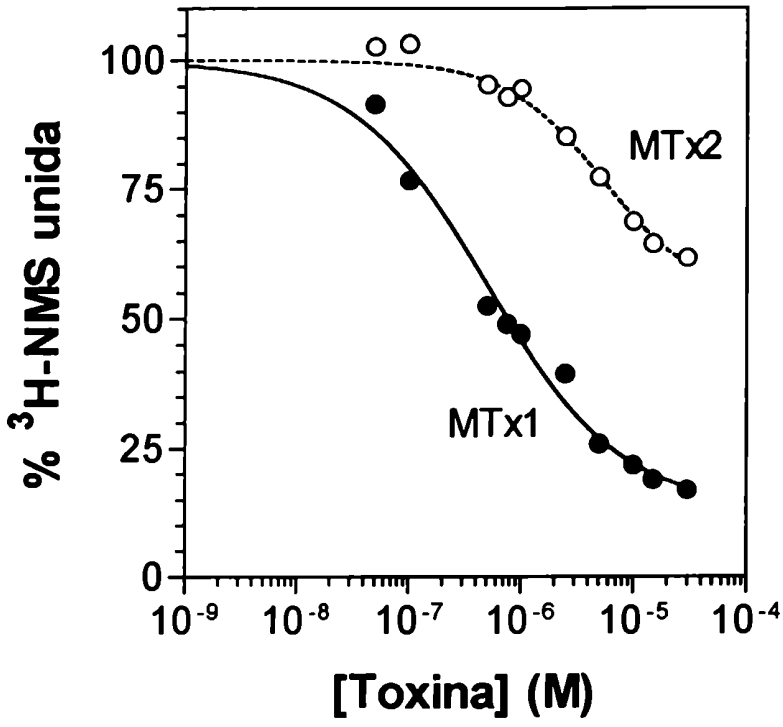


Figura II-14
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 y MTx2 en membranas de estriado de rata. Los valores de K_i fueron 84 nM para MTx1 y 1.1 µM para MTx2, con pisos de 13% y 53%, respectivamente.
Los números de Hill fueron 0.72 para MTx1 y 1.17 para MTx2, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas con pendiente variable.

Es notable la diferencia en el perfil de inhibición entre ambas toxinas, tanto en la afinidad como en el efecto máximo alcanzado.

La hipótesis explicativa que proponemos para este fenómeno, al igual que para corteza e hipocampo, es que, si bien MTx2 es menos potente, su capacidad discriminativa entre subtipos podría ser mayor que la de MTx1. Los subtipos de receptores involucrados serían principalmente m1 y m4.

Experimentos de inhibición:

Hemos utilizado membranas de páncreas de rata como fuente de receptores del subtipo M_3 nativo. Dicho órgano posee casi exclusivamente este subtipo (Waelbroeck y col., 1989, 1991). La puesta a punto de la técnica de fijación específica de radioligandos en membranas de este órgano resultó algo dificultosa, dada la fácil y rápida degradación de los receptores por la acción de las enzimas pancreáticas liberadas *post-mortem*. Las curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 y MTx2, obtenidas en esta preparación, se muestran en la Figura II-15.

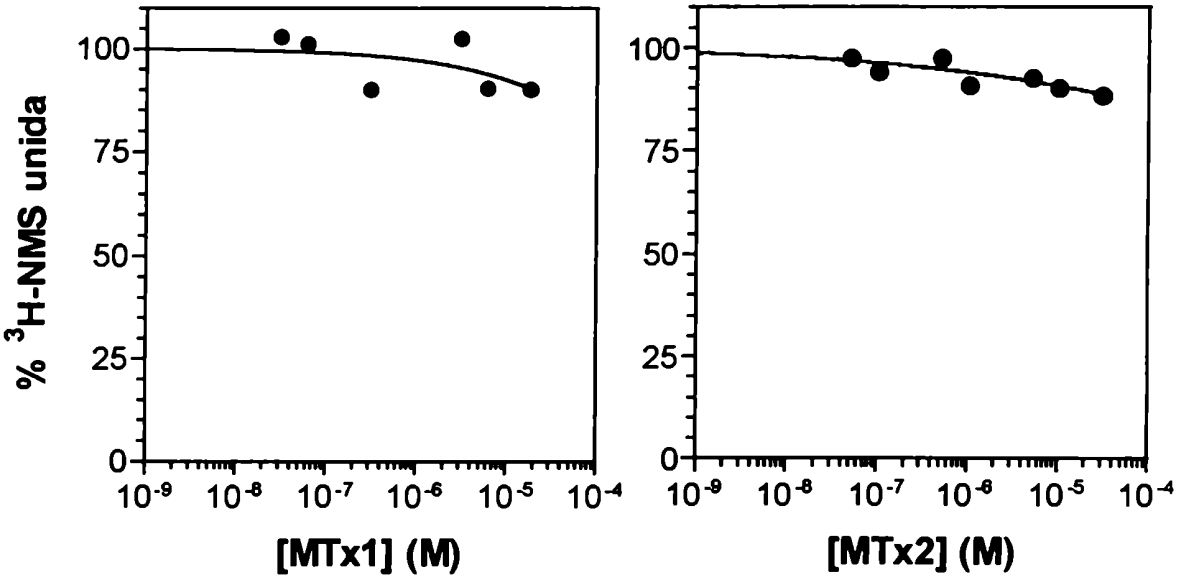


Figura II-15
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 (izquierda) y MTx2 (derecha) en membranas de páncreas de rata. Al no observarse inhibición apreciable en las concentraciones utilizadas de toxinas, no se determinaron los diversos parámetros del modelo.

Ninguna de las dos toxinas resultó capaz de inhibir la fijación de ^{3}H-NMS a las membranas de páncreas de rata en el rango de concentraciones usadas. Si se considera

a esta preparación como una fuente casi exclusiva del subtipo M_3 nativo, estos resultados refuerzan la idea de que MTx1 y MTx2 no actúan sobre el receptor M_3.

Ensayos de fijación específica de radioligandos en membranas de conducto deferente de rata y conejo

Experimentos de inhibición:

Hemos realizado experimentos de inhibición de la fijación específica de radioligandos en membranas de conducto deferente de rata y de conejo. La elección de esta estructura se debió a que, en experimentos farmacológicos/fisiológicos en el órgano aislado de conejo las MTxs se comportaron como agonistas muscarínicos, mientras que en el órgano aislado de rata, las MTxs no tuvieron efecto sobre las contracciones fásicas evocadas por estimulación eléctrica (ver capítulo IV). Entonces resultó de gran interés analizar el efecto de las MTxs sobre la unión de radioligandos en este órgano. El conducto deferente de conejo se eligió para los ensayos de órgano aislado porque presenta una respuesta fácilmente medible, mediada supuestamante por receptores M_1. El órgano de rata, en contraste, no posee ese subtipo de receptor.

Las curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS en membranas de conducto deferente de rata se pueden ver en la Figura II-16.

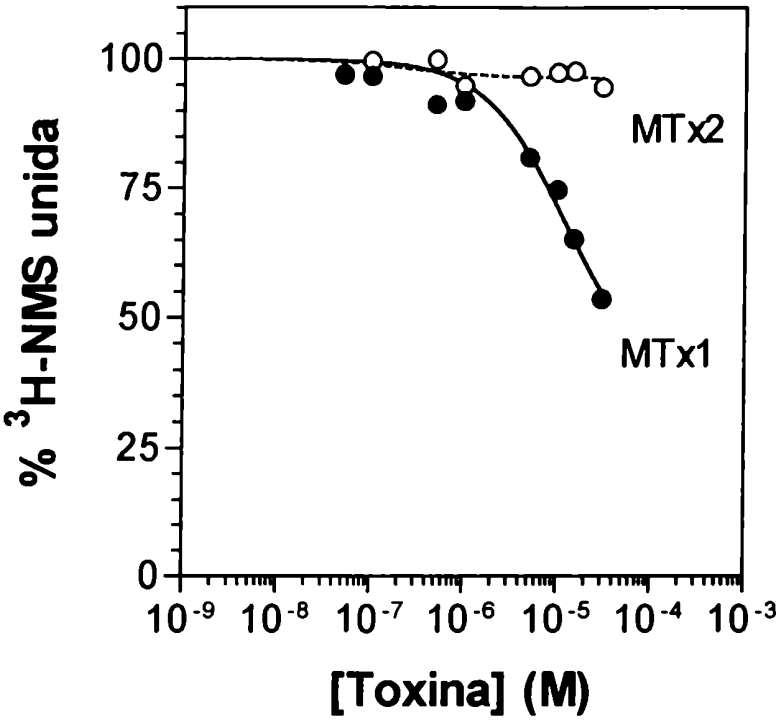


Figura II-16
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 y MTx2 en membranas de conducto deferente de rata. El valor de K_i fue 2.5 μM para MTx1, con un piso de 37%.
El número de Hill fue 0.65, cuando se ajustó a una curva sigmoidea de pendiente variable.

MTx2 resultó incapaz de inhibir la fijación de ^{3}H-NMS a membranas de conducto deferente de rata en el rango habitual de concentraciones que utilizamos. MTx1 sí fue capaz de inhibir, pero con una afinidad menor que en otras estructuras (como corteza cerebral, hipocampo y estriado de rata). Por lo tanto, podemos decir que estas toxinas muestran muy baja afinidad y no interactuarían con los receptores muscarínicos presentes en este órgano.

En contraste, MTx1 y MTx2 mostraron ser capaces de inhibir con afinidades relativamente altas (K_i = 229 y 911 nM) la fijación específica de ^{3}H-PRZ en esta preparación, al igual que lo hicieron en corteza cerebral. La curvas de inhibición se ven en la Figura II-17, en la cual se compara con la obtenida con el antagonista muscarínico clásico atropina.

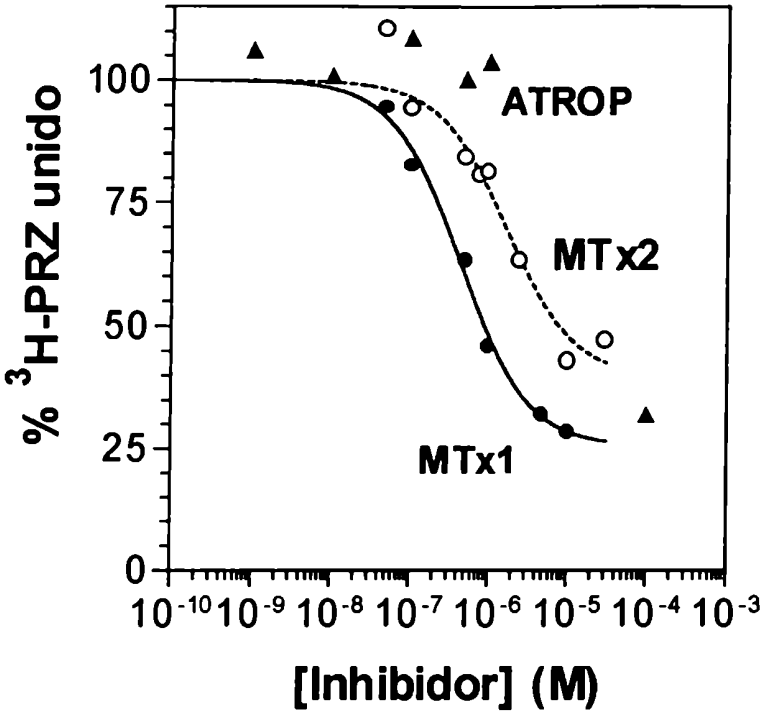


Figura II-17
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-PRZ por MTx1 y atropina (ATROP) en membranas de conducto deferente de rata. Los valores de K_i fueron 229 y 911 nM para MTx1 y MTx2, respectivamente, con pisos de 25 y 39%.
Los números de Hill fueron 0.99 y 1.24, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas con pendiente variable.

En conducto deferente de conejo, las toxinas sí inhibieron la fijación específica de ^{3}H-NMS con afinidad relativamente alta (Figura II-18). Esto se corresponde con la posible configuración farmacológica de este órgano en el conejo, siendo mucho más colinérgico que en la rata. Esto es coherente con lo visto por nosotros en los ensayos fisiológicos en ambos órganos (ver capítulo IV). También MTx1 y MTx2 fueron capaces de inhibir la unión de ^{3}H-PRZ con alta afinidad a membranas de conducto deferente de conejo (Figura II-19).

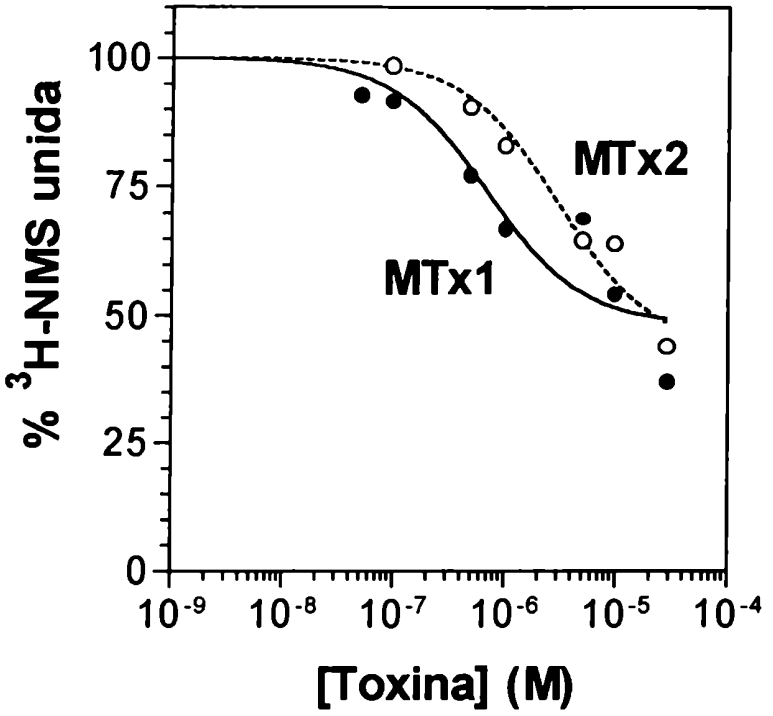
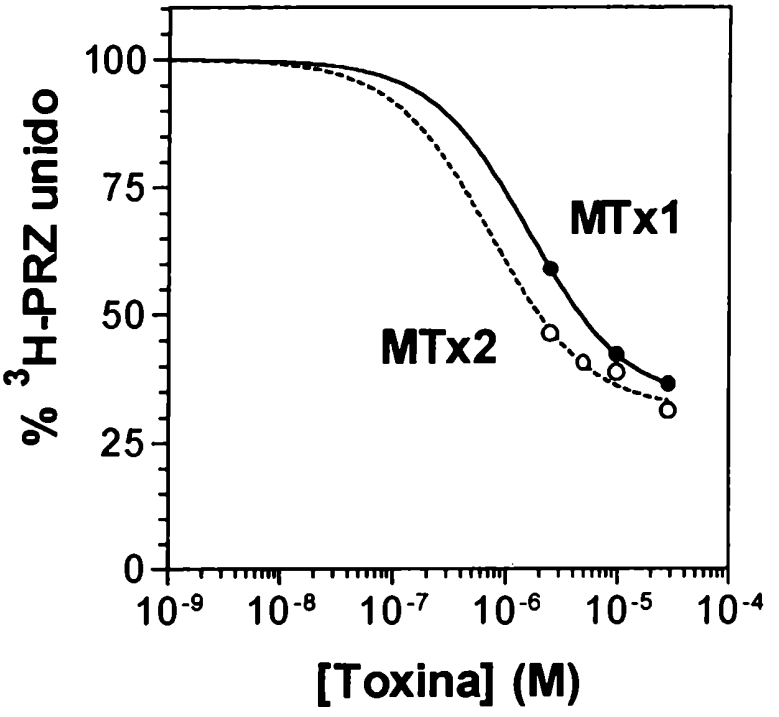


Figura II-18
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 y MTx2 en membranas de conducto deferente de conejo. Los valores de K_i fueron 154 y 689 nM para MTx1 y MTx2, con pisos de 48% y 43%, respectivamente.
Los números de Hill fueron 0.30 y 0.62, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas con pendiente variable.

Figura II-19
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-PRZ por MTx1 y MTx2 en membranas de conducto deferente de conejo. Los valores de K_i fueron 850 y 395 nM para MTx1 y MTx2, com pisos de 33 y 32%, respectivamente.
El número de puntos no permitió poder ajustar a curvas sigmoideas de pendiente variable.



Experimentos de saturación:

La toxina MTx2 fue radioiodinada, resultando las actividades específicas estimadas entre 59 a 76 µCi/µg. Este derivado iodinado fue utilizado para realizar curvas de saturación en membranas de corteza cerebral. La Figura II-20 muestra una curva de saturación de ^{125}I-MTx2, realizada en membranas sinaptosomales purificadas de corteza cerebral bovina.

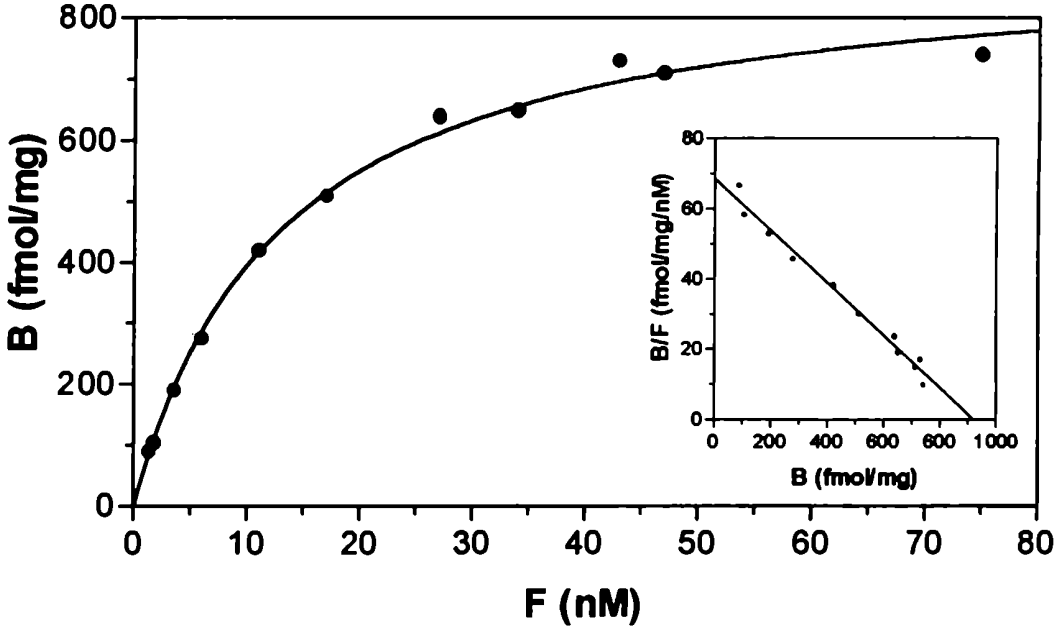


Figura II-20
Curva de saturación de la fijación específica de ^{125}I-MTx2 en membranas sinaptosomales purificadas de corteza cerebral bovina. La concentración de ^{125}I-MTx2 se expresó como ligando total en nM, estimada de la radioactividad medida (actividad específica 70 µCi/µg). El valor de K_D fue 14 nM y el de B_{max} fue 0.92 pmol/mg. El gráfico inserto corresponde al Scatchard.

Como se ve en la Figura II-20, hubo una unión saturable, que resultó reproducible en varios experimentos. Para la determinación de la fijación inespecífica se usó una concentración de MTx2 no marcada de 10 µM, y consistió en un 35% de la fijación total. Cuando se realizaron los experimentos en membranas sinaptosomales crudas, la fijación no específica fue aproximadamente un 50% de la total. Utilizando atropina 10 µM, se obtuvieron patrones similares de unión "inespecífica". Además, hubo una buena correlación entre unión específica y concentración de proteína, siendo lineal la relación desde 0.08 hasta 1 mg/ml. Los valores de saturación de la unión se alcanzan aproximadamente a 25 nM de ^{125}I-MTx2 (concentraciones estimadas) y la reacción alcanza un estado estacionario aproximadamente a las 2 hs a 4°C. Las curvas de saturación ajustaron a hipérbolas simples, con Scatchards lineales. Los valores de K_D fueron 17 ± 10 nM y los de B_{max} fueron 0.87 ± 0.11 pmol/mg en las membranas sinaptosomales purificadas.

EXPERIMENTOS CINÉTICOS

Disociación del radioligando muscarínico ^{3}H-PZ en presencia de MTx2

Considerando el hecho de que las toxinas se fijan a los receptores muscarínicos nativos, presuntamente del subtipo farmacológico M_1, decidimos ensayar la toxina MTx2 en experimentos cinéticos, utilizando un radioligando muscarínico con una selectividad relativa sobre dicho subtipo. El primer tipo de experimentos que hicimos fueron curvas de disociación de la fijación de ^{3}H-PZ en presencia de MTx2, lo que se muestra en la Figura II-21. En esta figura puede verse que ^{3}H-PZ presenta tasas de disociación similares en ausencia y en presencia de MTx2.

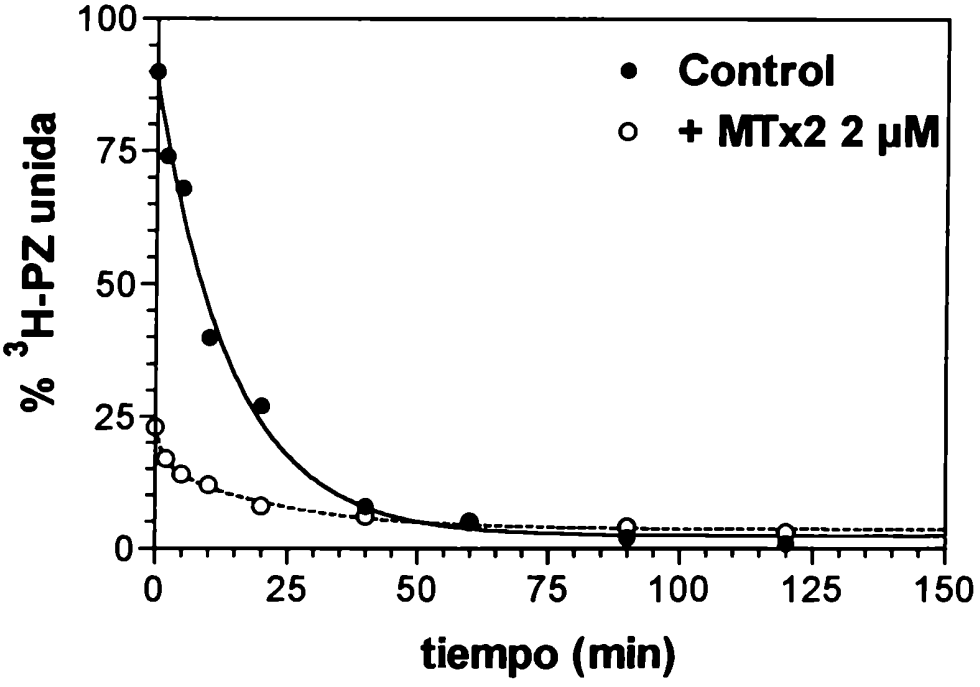


Figura II-21
Curvas de la disociación de la fijación específica de ^{3}H-PZ por el agregado de PZ 5 µM, en ausencia y presencia de MTx2 (2 µM), en membranas de corteza cerebral de rata. Las membranas fueron incubadas con ^{3}H-PZ hasta alcanzar el equilibrio, en ausencia o presencia de MTx2, luego de lo cual se indujo su disociación por el agregado de exceso de PZ. Los valores de $T_{1/2}$ fueron 10 y 7.7 min, respectivamente. El valor de equilibrio de la unión específica (100%) del control fue de 11450 dpm, mientras el incubado con MTx2 partió desde un 23 % de ese valor.

De un modo análogo a lo mostrado en la figura anterior, estudiamos la disociación de ^{3}H-PZ por MTx2, en comparación con la propia PZ no marcada (Figura II-22).

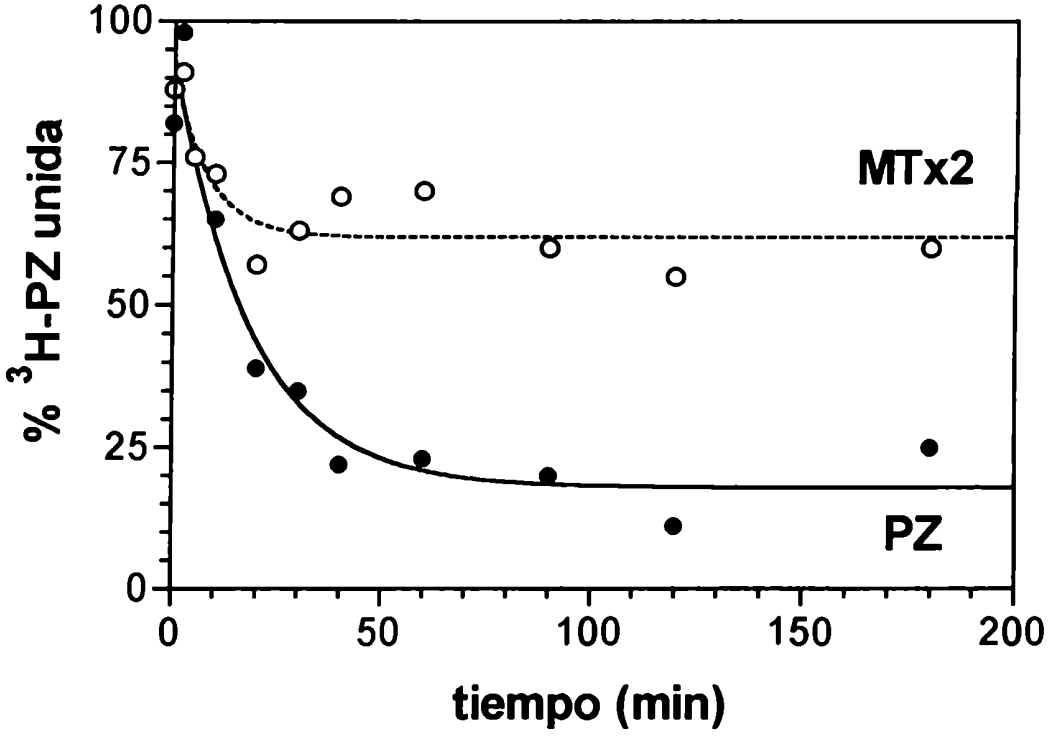


Figura II-22
Curvas de disociación de la fijación específica de ^{3}H-PZ por el agregado de PZ 2.5 μM o MTx2 2.5 μM, en membranas de corteza cerebral de rata. Las membranas fueron incubadas con ^{3}H-PZ hasta alcanzar el equilibrio, luego de lo cual se indujo su disociación por el agregado de exceso de PZ o por MTx2. Los valores de $T_{1/2}$ fueron 5 y 13 min, respectivamente. El valor de equilibrio de la unión específica (100%) del control fue de 5900 dpm, siendo el mismo para ambos casos.

El gráfico de la Figura II-22 nos muestra indirectamente la fijación de MTx2 a los receptores de los cuales desplaza al ligando ^{3}H-PZ de las membranas nativas de corteza cerebral.

Experimentos de asociación:

Debido a ciertos resultados obtenidos en experimentos fisiológicos en órgano aislado (ver capítulo IV), resultó necesario investigar la posible irreversibilidad de la unión de las toxinas MTx1 y MTx2 a los receptores muscarínicos. Es sabido que otras toxinas naturales, específicamente de veneno de serpientes, como la α-bungarotoxina, se unen a sus blancos moleculares —en el caso citado, el receptor nicotínico— en forma irreversible (ver Chiappinelli, 1991). Para ello, hemos utilizado una estrategia que consiste en preincubar los receptores —nativos o clonados— con las toxinas, luego centrifugar, con el objetivo de eliminar las moléculas de toxina no unidas, para evaluar a continuación la capacidad de unión de los receptores a un radioligando muscarínico, en este caso ^{3}H-NMS (para detalles, ver sección Materiales y Métodos).

Las Figuras II-23 y II-24 muestran las curvas de asociación de la unión de ^{3}H-NMS realizadas en estas condiciones, luego de preincubar con MTx1 y MTx2.

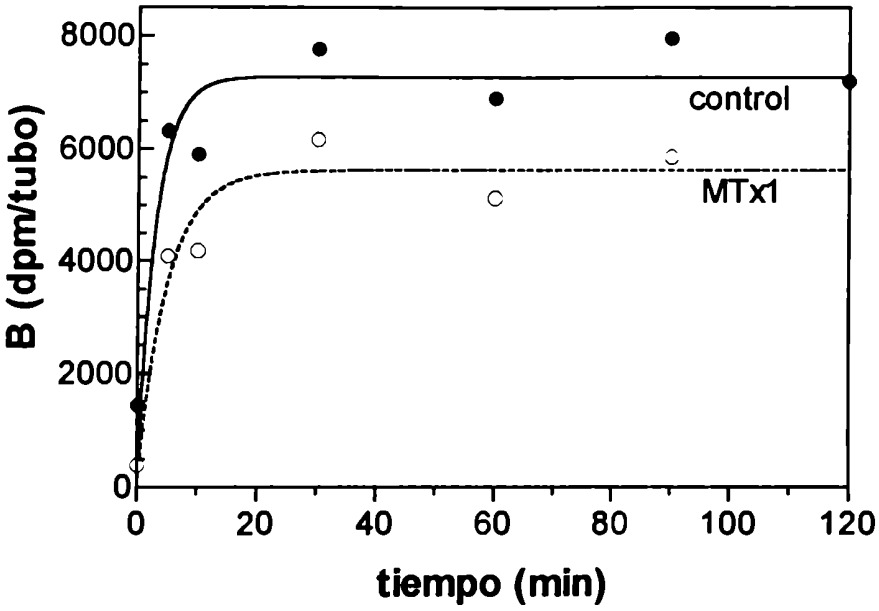
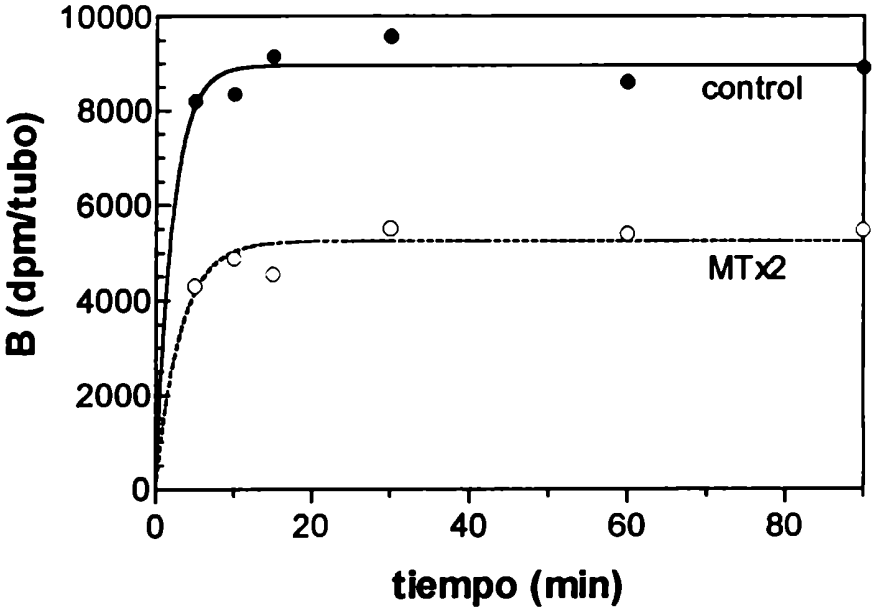


Figura II-23
Prueba de reversibilidad de MTx1 en membranas de corteza cerebral de rata. El gráfico representa las curvas de asociación de la unión de ^{3}H-NMS a membranas de corteza cerebral de rata preincubadas en ausencia (control) o presencia de MTx1 1 µM y luego centrifugadas y resuspendidas. Los valores de $T_{1/2}$ fueron 2.08 y 3.39 min, respectivamente. El valor de equilibrio de la unión específica (100%) del control fue de 7273 dpm, mientras el preincubado con MTx1 alcanzó un 77% de ese valor.

Figura II-24
Prueba de reversibilidad de MTx1 en membranas de corteza cerebral de rata. El gráfico representa las curvas de asociación de la unión de ^{3}H-NMS a membranas de corteza cerebral de rata preincubadas en ausencia (control) o presencia de MTx2 5 µM y luego centrifugadas y resuspendidas. Los valores de $T_{1/2}$ fueron 1.47 y 2.19 min, respectivamente. El valor de equilibrio de la unión específica (100%) del control fue de 8956 dpm, mientras el preincubado con MTx2 alcanzó un 59% de ese valor



Como se observa en los gráficos anteriores, la preincubación con MTx1 y MTx2 produce un decremento en la capacidad de unión específica de ^{3}H-NMS a los receptores muscarínicos nativos de membranas de corteza cerebral. La cinética de asociación de ^{3}H-NMS no se encuentra afectada, por lo tanto se puede decir que este radioligando se une a los receptores a los que las moléculas de toxina no se unieron, en una forma convencional. Durante los largos tiempos estudiados (90-120 min), no se muestra una recuperación de la unión de ^{3}H-NMS hacia los valores controles, por lo que se puede pensar que las toxinas tendrían un carácter de fijación al receptor muscarínico de tipo irreversible o con una cinética muy lenta de disociación.

En experimentos análogos, utilizando ^{3}H-PRZ, las toxinas no mostraron el carácter irreversible visto con ^{3}H-NMS, cuando se comparan los valores obtenidos con los correspondientes a las curvas de inhibición en equilibrio (Figuras II-8 y II-9). Por lo tanto, la unión a los receptores adrenérgicos sería de carácter reversible (Figura II-25).

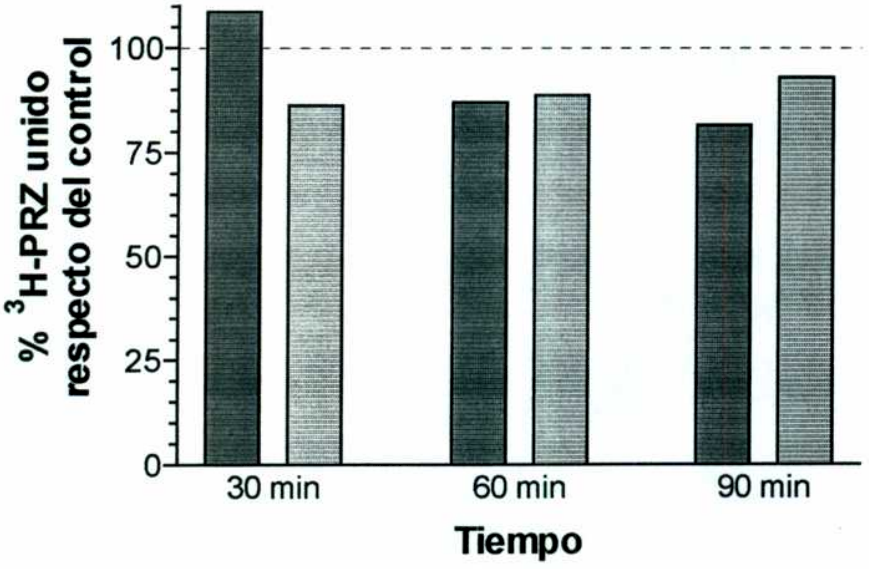


Figura II-25
Prueba de reversibilidad de MTx1 y MTx2 en los receptores adrenérgicos de membranas de corteza cerebral de rata. El gráfico de barras representa el porcentaje respecto del control, de unión de ^{3}H-PRZ, en membranas preincubadas con MTx1 2 µM ó MTx2 10 µM y luego centrifugadas y resuspendidas.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO II

En el primer reporte sobre la existencia de las toxinas MTx1 y MTx2, Adem y col. (1988), describieron que dos fracciones del veneno de la mamba verde inhibían parcialmente la fijación específica de ^{3}H-QNB a membranas de cerebro de rata. Ambas toxinas mostraron potencias similares en el desplazamiento de ^{3}H-QNB, así como también una inhibición máxima de alrededor del 50%, sugiriendo una posible selectividad de dichas toxinas por algún subtipo de receptor muscarínico.

Existe una fuerte y reconocida evidencia de que el antagonista muscarínico ^{3}H-QNB se une de una manera monofásica y simple a los receptores muscarínicos (Yamamura y Snyder, 1974a,b; Birdsall y col., 1978). Lo mismo puede decirse del antagonista ^{3}H-NMS.

Nosotros hemos obtenido resultados similares con la fijación de ^{3}H-QNB y de ^{3}H-NMS, ligandos no selectivos de los receptores colinérgicos muscarínicos. Además, encontramos también que las toxinas inhiben sólo alrededor de un 30% de la fijación en membranas preparadas a partir de tallo cerebral de rata. Esto es coherente, dado que en esta estructura existe una mayor proporción de receptores M_2 que en corteza cerebral (Frey y Howland, 1992), los que son insensibles a las toxinas según los ensayos en receptores clonados y en aurícula de cobayo (ver capítulo III; Jerusalinsky y col., 1992a).

El hecho de que las MTxs inhibieron hasta un 60% de la unión específica de ^{3}H-QNB y ^{3}H-NMS en membranas de corteza cerebral, mientras que no afectan la unión de algunos radioligandos a otros neurorreceptores, como ^{3}H-AMPA, ^{3}H-flunitrazepam y ^{3}H-muscimol, y sólo débilmente afectan la unión de ^{125}I-bungarotoxina a receptores nicotínicos, sugiere que las toxinas interactúan específicamente con los receptores muscarínicos, aunque no de igual manera con todos los subtipos.

Cuando se realizaron las interacciones de fijación específica utilizando ^{3}H-PZ, con concentraciones en las que este radioligando se une preferencialmente al subtipo M_1 de receptor muscarínico, MTx1 y MTx2 inhibieron más del 80% de la fijación específica (Figura II-4). Utilizando pirenzepina, se encontró que la relación M_1/M_2 (sitios de alta y baja afinidad) en membranas de corteza cerebral es más alto que en membranas de tallo cerebral (Cortés y Palacios, 1986). El número máximo de sitios por ^{3}H-PZ es alrededor de un 50-60% del de ^{3}H-QNB o ^{3}H-NMS en membranas de corteza cerebral. Estas diferencias pueden explicar la mayor inhibición por parte de las MTxs de la unión de ^{3}H-QNB en corteza que en tallo cerebral (Figuras II-1 y II-3).

Estos resultados llevan a la conclusión parcial de que dichas toxinas pueden unirse selectivamente a receptores muscarínicos centrales con alta afinidad por PZ, es decir, del subtipo M_1 (Jerusalinsky y col., 1992a).

Las toxinas muscarínicas también fueron capaces de inhibir la fijación específica de los radioligandos ^{3}H-AF-DX 384 y ^{3}H-PBCM. El primero está reportado como un radioligando relativamente selectivo para el subtipo M_2 (Entzeroth y Mayer, 1990; Miller y col., 1991; Aubert y col., 1992; Mickala y col., 1996). Tanto la afinidad como la potencia de MTx1 fueron bajas para este radioligando, el cual además podría estar uniéndose en parte al subtipo farmacológico M_1 en una importante proporción (Karlsson y col., 1994; Jolkkonen y col., 1995a). Como también ha sido reportado por Karlsson y col. (1994), es posible que este radioligando sea desplazado de otros subtipos de receptor, como son M_1 y M_4. Distinto es el caso del radioligando ^{3}H-PBCM, que presenta una unión irreversible con todos los subtipos de receptor muscarínico. Aquí la toxinas presentaron mayor inhibición máxima, comparado con MTx1 y ^{3}H-AF-DX 384 (Figuras II-5 y II-6). MTx1 nuevamente presentó mayor afinidad que MTx2.

Las toxinas MTx1 y MTx2 fueron también capaces de inhibir en una alta proporción la fijación específica de un agonista muscarínico como es ^{3}H-Oxo-M (Figura

II-7). Las curvas de inhibición resultaron más pronunciadas (números de Hill de 1.87) que las obtenidas con agonistas clásicos, lo cual sería explicable por el carácter agonista del radioligando utilizado, siendo bastante común la obtención de números de Hill alejados del valor unitario cuando se utilizan agonistas como marcadores. Ha sido reportado que el agonista muscarínico ^{3}H-OxoM se une preferencialmente al/los subtipo/s de receptor con alta afinidad por agonistas en las condiciones experimentales usadas (Raskovsky y col., 1988). El número máximo de sitios de unión (B_{max}) para este agonista fue alrededor de un 20% de los de ^{3}H-QNB o ^{3}H-NMS en corteza cerebral. Por lo tanto, el 80% de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-OxoM en membranas de corteza cerebral (Figura I-7) sugiere que las MTxs podrían estar uniéndose a este estado de receptor central. Sin embargo, el número de Hill de 1.87 y el pequeño decremento en la B_{max} (-19%, Tabla I-A) podrían estar señalando otro tipo de interacción, como la presencia de una población heterogénea de sitios, o bien un efecto alostérico.

No resultó posible realizar buenos ensayos de fijación específica de ^{3}H-OxoM en membranas de tallo cerebral para evaluar una posible inhibición por las MTxs en esa área. Posiblemente esto fue debido a la poca cantidad de receptores muscarínicos que se encuentran en esa zona y a la pequeña proporción presente del supuesto subtipo de receptor sensible a las MTxs.

Los experimentos de saturación con ^{3}H-NMS, ^{3}H-QNB, ^{3}H-PZ y ^{3}H-Oxo-M (Figuras II-10, II-11, II-12 y Tabla II-A) sugieren un tipo de interacción competitiva de las toxinas con los receptores muscarínicos. En todos los casos se vieron los principales efectos de las toxinas sobre la afinidad, más que en el número máximo de sitios.

Estos resultados, que sugieren un tipo de interacción competitiva reversible con los receptores, se encuentran en discordancia con los obtenidos en los experimentos

cinéticos. En estos experimentos (Figuras II-23 y II-24) se evidencia el caracter irreversible o de cinética de disociación muy lenta, de la unión de las toxinas a los receptores muscarínicos de corteza cerebral. Como se describe en el capítulo IV, los experimentos en conducto deferente de conejo muestran que los efectos de las toxinas MTx1 y MTx2 tampoco fueron revertidos por lavado de la preparación, lo que concuerda con los resultados de los experimentos cinéticos.

Las curvas de inhibición realizadas en membranas nativas de otras estructuras muestran que no existe ningún tipo de interacción de las toxinas sobre los receptores muscarínicos presentes en páncreas de rata (Figura II-15). Teniendo en cuenta que en este órgano los receptores muscarínicos serían exclusivamente del subtipo M_3 (Waelbroeck y col., 1987a,b, 1989, 1991), concluimos que MTx1 y MTx2 no presentan interacción con este subtipo de receptor de rata, lo que se encuentra corroborado por los resultados obtenidos con los subtipos puros de receptor muscarínico humano (capítulo III). Asimismo, se había observado una pobre interacción con membranas de aurícula de cobayo, que contienen receptor predominantemente del subtipo M_2 (Jerusalinsky y col., 1992a).

Por otro lado, MTx1 y MTx2 presentan un patrón algo similar de inhibición en membranas de hipocampo, respecto a lo visto en corteza (Figura II-13), mientras es más marcada la diferencia entre las curvas de ambas toxinas en membranas de estriado (Figura II-14). Como se verá en el siguiente capítulo, con subtipos puros de receptores clonados, esta diferencia podría deberse a la diferencia en las selectividades por los subtipos de receptor m1 y m4 por parte de las toxinas. La diferencia en los perfiles obtenidos entre hipocampo y estriado podría ser explicada si en estriado existiera una alta proporción del subtipo m4, en contraposición con el hipocampo y la

corteza, donde se encontraría una mayor proporción de receptores del subtipo m1, y este es efectivamente el caso (Frey y Howland, 1992).

Los experimentos de inhibición realizados en membranas de páncreas de rata (Figura II-15) revelaron la falta de interacción de ambas toxinas sobre los receptores muscarínicos en este órgano, que serían casi exclusivamente del subtipo M_3 (Waelbroeck y col., 1987a,b; 1989; 1991), lo que resulta congruente con lo visto por nosotros en los experimentos con receptores clonados humanos (capítulo III).

Para una visión comparativa entre distintas áreas, de la inhibición por las toxinas en los receptores muscarínicos se muestran los datos combinados en la Figura II-26.

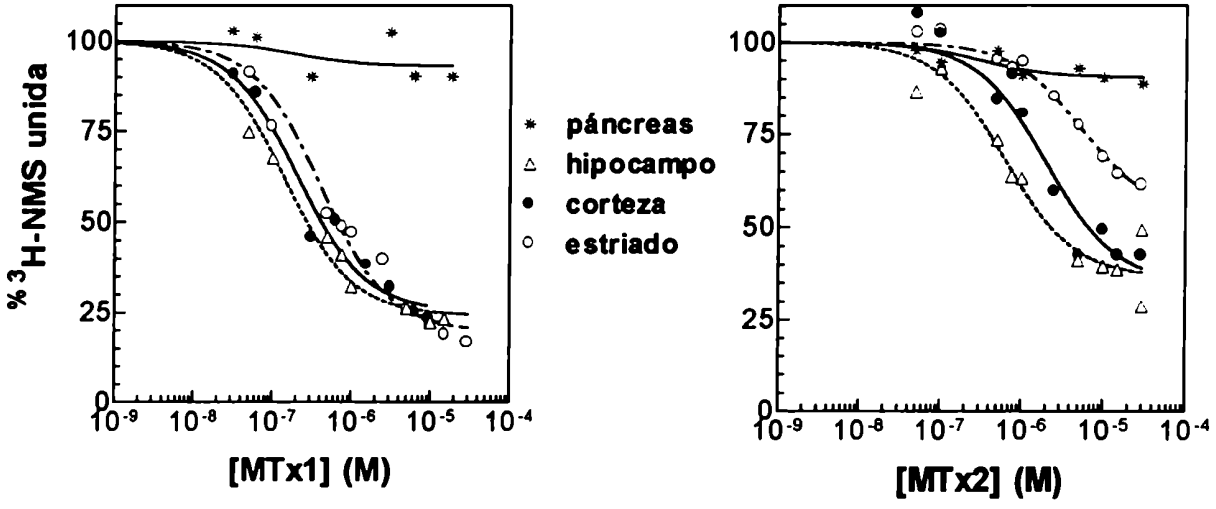


Figura II-26
Curvas de inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS por MTx1 y MTx2 en membranas de distintos tejidos. Los datos corresponden a los de las Figuras II-2, II-13, II-14 y II-15.

Para confirmar el tipo de efecto observado y obtener datos sobre el resto del cerebro, se ensayó con otro tipo de técnica de fijación específica: en lugar de incubar sinaptosomas se incubaron cortes de cerebro de rata, obteniéndose autorradiogramas y analizándose densitométricamente, lo que se muestra en el capítulo V.

Los experimentos realizados en conducto deferente de rata mostraron que las toxinas interactúan poco o nada con los receptores muscarínicos presentes en la preparación (Figura II-16). MTx2 fue incapaz de inhibir la fijación de ^{3}H-NMS a membranas de conducto deferente de rata en el rango habitual de concentraciones que utilizamos. MTx1 inhibió con una afinidad menor que la observada en otras preparaciones (corteza cerebral, estriado, etc.). Las toxinas MTx1 y MTx2, por lo tanto, no muestran una afinidad significativa por los receptores muscarínicos presentes en este órgano, lo cual sugiere que el receptor muscarínico presináptico no sería del subtipo M_1. Ha sido postulado que los receptores presinápticos serían en cierta forma atípicos, debido al complicado perfil farmacológico que exhiben, respecto a distintos agentes muscarínicos analizados, mientras los receptores postsinápticos son considerados como del subtipo M_3 (Miranda y col., 1994).

Si bien las toxinas MTx1 y MTx2 no afectaron la fijación específica de algunos radioligandos para otros sistemas de receptores, como son ^{3}H-flunitrazepam —benzodiazepínico—, ^{3}H-AMPA —glutamatérgico no-NMDA—, ^{3}H-muscimol —$GABA_A$—, sí lo hicieron sobre la fijación de ^{3}H-prazosin —ligando α-adrenérgico—. Las toxinas inhibieron la fijación de ^{3}H-prazosin, tanto en membranas de corteza cerebral de rata como de conducto deferente de rata y de conejo (Figuras II-8, II-9 y II-17), en contraste con la atropina —antagonista muscarínico clásico—, que solamente tuvo efecto con una muy alta concentración (100 μM, Figura II-8). La interacción con receptores

adrenérgicos fue, en cierta forma, previsible para nosotros debido a los efectos de las toxinas en la preparación de conducto deferente (ver capítulo IV). Resulta extraño, sin embargo, el hecho de la existencia de una interacción sobre un receptor heterólogo, como el adrenérgico, y la ausencia de interacción sobre otros subtipos de receptores muscarínicos, homólogos, como por ejemplo, los presentes en páncreas (Figura II-15). El ^{3}H-PRZ no se une a receptores muscarínicos en esas concentraciones (no mostrado).

Paralelamente, MTx1 y MTx2 pudieron inhibir la fijación específica de ^{3}H-PRZ en membranas de conducto deferente de rata, presentando una afinidad relativamente alta (Figura II-17), de la misma forma que ocurrió para corteza cerebral (Figura II-8 y II-9).

En conducto deferente de conejo, las toxinas sí inhibieron con afinidad relativamente alta la fijación específica de ^{3}H-NMS (Figuras II-18). Esto concuerda con el efecto que observamos en los experimentos fisiológicos en este órgano y con lo reportado en los trabajos farmacológicos/fisiológicos, acerca de la naturaleza de este receptor presináptico (capítulo IV).

Los perfiles de inhibición vistos con MTx1 y MTx2 se hallan en concordancia con los resultados de los experimentos fisiológicos (ver capítulo IV). Los receptores muscarínicos presentes en el conducto deferente de rata serían básicamente del subtipo M_2 postsinápticos, con receptores presinápticos atípicos (Miranda y col., 1994). En consecuencia, podemos decir que las toxinas muscarínicas no presentan afinidad por los receptores presentes en este órgano de rata, siendo esto coherente con los resultados fisiológicos (capítulo IV) y con los de receptores clonados (capítulo III). En contraste, los receptores adrenérgicos sí se ven afectados por las toxinas, tal como puede verse en los resultados fisiológicos (capítulo IV).

Los experimentos realizados con conducto deferente de rata se hicieron debido a que teníamos dudas sobre un posible efecto adrenérgico de las MTxs. Este órgano de

rata es principalmente "adrenérgico", en contraposición al de conejo, que es mucho más "colinérgico".

La composición de receptores en el conducto deferente de conejo sería cualitativamente distinta a la de rata. Trabajos previos mostraron que el conducto deferente de conejo está provisto de receptores muscarínicos presinápticos que median una inhibición de la liberación de noradrenalina por retroalimentación negativa, siendo probablemente del subtipo M_1 (Grimm y col., 1994a). Esto resulta congruente con nuestros resultados de fijación específica, en donde las toxinas inhiben la fijación del radioligando ^{3}H-NMS con afinidad relativamente alta (K_i = 150 nM y 690 nM, Figura II-18) y también con los resultados fisiológicos (capítulo IV), donde MTx1 y MTx2 presentan un efecto inhibitorio de las contracciones.

Al igual que en rata, las toxinas también afectarían también los receptores adrenérgicos postsinápticos, aunque la interacción sería de un carácter reversible, en contraposición con el carácter irreversible visto para los receptores muscarínicos. Como se ve en el capítulo IV, al lavar la preparación, lo que queda de inhibición en el conducto deferente de conejo es debido probablemente al bloqueo por las MTxs sobre los receptores M_1 presinápticos en forma irreversible.

Los experimentos realizados con ^{125}I-MTx2 mostraron que existe una fijación específica, saturable a partir de aproximadamente 25 nM, con una K_D de alrededor de 17 nM y B_{max} de 0.87 pmol/mg en membranas sinaptosomales purificadas de corteza cerebral (Figura II-21). MTx2 posee 2 residuos de tirosina capaces de ser iodinados, en las posiciones 30 y 36 (ver Tabla I-B). Al purificarse por RP-HPLC los derivados iodinados se obtuvieron tres picos, seleccionándose el más homogéneo, con mayor potencia inhibitoria y con el tiempo de retención más cercano al del péptido original (ver Materiales y Métodos). Posiblemente este derivado utilizado sea monoiodinado.

El sitio de iodinación no ha sido hasta el momento determinado, aunque puede suponerse que sea probablemente la tirosina en posición 30. Este residuo es común e invariante en todas las toxinas muscarínicas de las que se conoce la secuencia. El método utilizado de cloramina T (Greenwood y col., 1963; ver Materiales y Métodos) marca sólo tirosinas y se realiza durante un corto tiempo (30-60 seg), usando exceso de toxina. En estas condiciones se iodinan sólo un 1-2% de las moléculas y solamente se incorpora 1 átomo de ^{125}I en la tirosina más reactiva, que probablemente sea la de la posición 30, dado que se encuentra en la posición más expuesta (ver Figura I-4).

Últimamente hemos intentado marcar las toxinas con ^{3}H-anhídrido acético, pero la actividad específica obtenida no resultó la adecuada para avanzar con los experimentos de medición directa de la fijación de las MTxs.

El experimento cinético de la Figura II-20 nos muestra que el radioligando ^{3}H-PZ se disocia con la misma cinética de los receptores en ausencia y presencia de MTx2. Por lo tanto esto lleva a la idea de que la toxina no modifica la interacción PZ-receptor mas que en forma competitiva, ocupando los sitios a los que ^{3}H-PZ se une.

Los experimentos cinéticos nos muestran indirectamente la fijación de MTx2 a los receptores muscarínicos, al desplazar la unión de ^{3}H-PZ de los mismos (Figura II-21). Asimismo puede observarse que la inhibición por MTx2 llega a su estado estacionario aproximadamente a los 40 min, con un valor de $T_{1/2}$ de 14 min. En los experimentos en equilibrio mostrados en el presente y en el siguiente capítulo, el tiempo de incubación con las toxinas fue igual o mayor a ese valor de $T_{1/2}$.

La preincubación con MTx1 y MTx2 produce un decremento en la capacidad de unión específica de ^{3}H-NMS a los receptores muscarínicos nativos de membranas de corteza cerebral (Figuras II-23 y II-24). ^{3}H-NMS mostró, asimismo, una cinética de

unión similar cuando las membranas fueron preincubadas en ausencia y presencia de MTxs, por lo tanto, podemos decir que este radioligando se une a los receptores a los que las moléculas de toxina no se unieron, en una forma convencional.

El hecho de incubar largos tiempos (90-120 min) y no observar una recuperación de la unión de ^{3}H-NMS hacia los valores controles, lleva a pensar que las toxinas tendrían una fijación al receptor muscarínico de tipo irreversible o con una cinética muy lenta de disociación.

En contraposición a lo visto en los receptores muscarínicos, en los adrenérgicos las MTxs no mostraron un tipo de unión irreversible. En la Figura II-25 se ve que, al contrario de lo que ocurrió con ^{3}H-NMS, con ^{3}H-PRZ no se vió decrementada la unión por el hecho de preincubar con las toxinas, en concentraciones en las que en los experimentos de equilibrio producen una inhibición evidente (ver Figuras II-8 y II-9).

Capítulo III

Ensayos de fijación específica en receptores colinérgicos muscarínicos clonados

En el capítulo anterior se analizaron los efectos de las toxinas muscarínicas MTx1 y MTx2 sobre la fijación específica de radioligandos muscarínicos, en membranas de tejidos nativos de rata y conejo. En el presente capítulo nos dedicaremos a exponer los efectos sobre los subtipos puros del receptor. Para ello, los experimentos de fijación específica de radioligandos se realizaron en subtipos de receptores provenientes de dos fuentes distintas (ver Materiales y Métodos):

- Receptores muscarínicos humanos de los subtipos m1 y m2 clonados, expresados en células Sf9 de insecto e incorporados en membranas artificiales, cedidos por el Dr. Gabriel Berstein de la Universidad de Texas, USA (Parker y col., 1991; Berstein y col., 1992a,b).
- Receptores muscarínicos humanos de los cinco subtipos conocidos (m1-m5) clonados, expresados en membranas de células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus, obtenidos de BioSignal Inc. (Montreal).

En los ensayos de fijación específica realizados en membranas nativas, que contienen mezclas de los distintos subtipos de receptor, la interpretación de los resultados suele ser complicada y las conclusiones, en cierta medida, indirectas. En cambio, los experimentos con subtipos puros de receptor permiten eliminar la ambigüedad en cuanto a los subtipos involucrados y los resultados son más concluyentes.

Las figuras que se muestran en este capítulo corresponden a experimentos representativos de entre 3 a 7 diferentes (con las correspondientes repeticiones por duplicado o triplicado), excepto la figura III-11, que corresponde a un experimento.

EXPERIMENTOS EN EQUILIBRIO

Ensayos de fijación específica en receptores m1 y m2 expresados en células Sf9 e incorporados en membranas artificiales

En la necesidad de contar con un sistema apropiado para los estudios de fijación específica de radioligandos con subtipos puros de receptor, conseguimos en una primera instancia los subtipos m1 y m2 humanos expresados en células Sf9 de insecto e incorporados en liposomas.

Experimentos de inhibición:

Como se mencionó, los primeros ensayos de inhibición de la fijación específica de radioligandos muscarínicos por las toxinas muscarínicas MTx1 y MTx2 en receptores clonados se realizaron en los subtipos m1 y m2 humanos. MTx1 y MTx2 fueron capaces de inhibir la fijación específica del antagonista no selectivo ^{3}H-QNB al subtipo m1 (Figuras III-1 y III-3), mientras que la fijación al subtipo m2 no parece afectada (Figuras III-2 y III-3). Como comparación se muestran las curvas de inhibición de dos antagonistas muscarínicos, uno no selectivo (atropina) y otro parcialmente selectivo por el subtipo farmacológico de receptor M_1, la pirenzepina (Figura III-1).

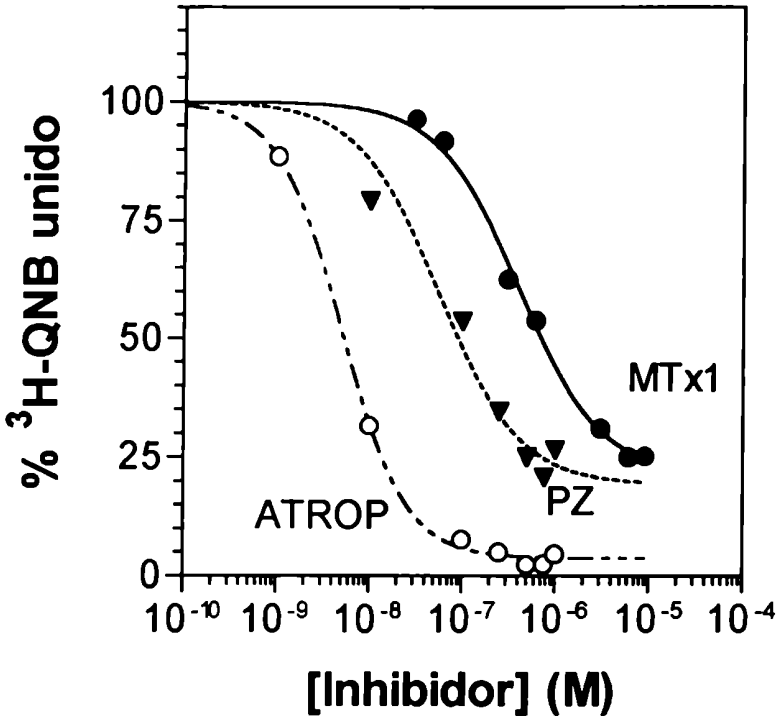


Figura III-1
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-QNB en el subtipo de receptor m1 humano expresados en células Sf9 de insecto e incorporado en membranas artificiales, por MTx1, atropina (ATROP) y pirenzepina (PZ). El valor de K_i fue 123 nM para MTx1 en m1, con un piso de 22%. El número de Hill fue 1.08. Se muestran las curvas con atropina y pirenzepina con el fin de ejemplificar los comportamientos de un ligando no selectivo (atropina) y uno parcialmente selectivo (pirenzepina).

Figura II-2
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-QNB en el subtipo de receptor m2 humano expresado en células Sf9 de insecto e incorporado en membranas artificiales, por MTx1, atropina (ATROP) y pirenzepina (PZ). En el receptor m2, al no haber inhibición evidente, no se ajustó a ningún modelo. Se muestran las curvas con atropina y pirenzepina con el fin de ejemplificar los comportamientos de un ligando no selectivo (atropina) y uno parcialmente selectivo (pirenzepina).

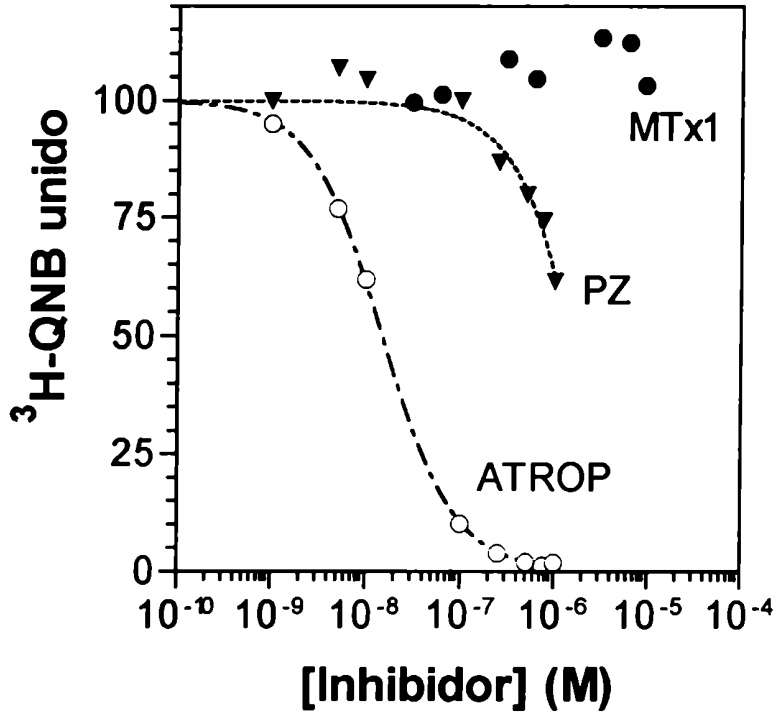
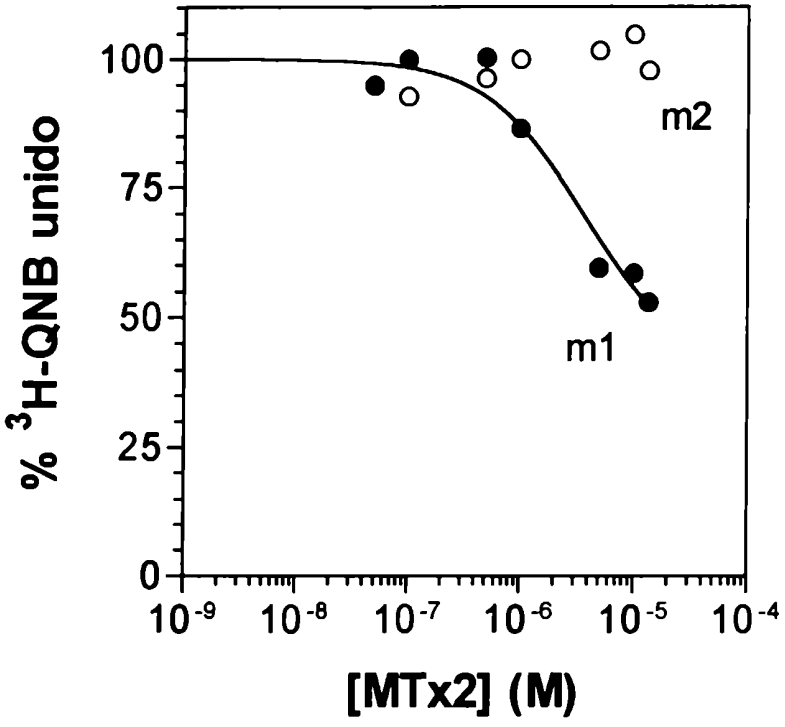


Figura III-3
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-QNB por MTx2 en los subtipos de receptor m1 y m2 humanos expresados en células Sf9 de insecto e incorporados en membranas artificiales. El valor de K_i fue 891 nM para los receptores m1, con un piso de 40%.



En las Figuras III-1, III-2 y III-3 se puede ver la selectividad de las toxinas MTx1 y MTx2 por el subtipo m1 de receptor, comparado con el subtipo m2. En el rango de concentraciones utilizado, desde 50 nM hasta 10 µM de las toxinas, la fijación de ^{3}H-QNB no se vio afectada en el receptor m2, mientras la inhibición fue evidente en el m1. Con el fin de comparar se muestran las inhibiciones de la unión de ^{3}H-QNB por atropina, similar en ambos subtipos de receptor (K_i = 1 nM y 3 nM, en m1 y m2, respectivamente), y por pirenzepina, más potente en el subtipo m1 (K_i = 9 nM y 200 nM, en m1 y m2, respectivamente). Si bien las afinidades de ambas toxinas por el receptor m1 son menores que la de pirenzepina, demuestran discriminar mejor entre estos dos subtipos.

Experimentos de saturación:

Se procedió a estudiar el efecto de las toxinas en experimentos de saturación de los sitios en el subtipo m1. Las Figuras III-4 y III-5 muestran curvas de saturación de la fijación de ^{3}H-NMS a receptores m1 en ausencia y presencia de MTx1 y MTx2, respectivamente.

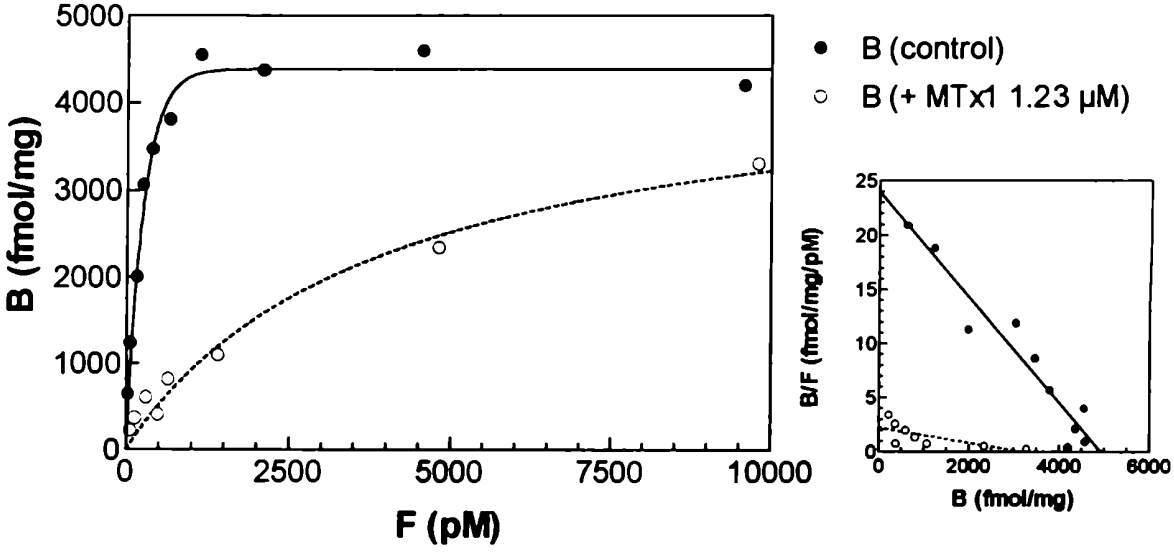


Figura III-4
Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-NMS en el subtipo m1 de receptor humano expresado en células Sf9 de insecto, en ausencia y presencia de MTx1 (1.23 µM). Los valores de K_D fueron 169 pM en ausencia de MTx1 y 3822 pM en presencia de MTx1. Los valores de B_{max} fueron 4.7 pmol/mg y 4.5 pmol/mg, respectivamente. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard correspondiente.

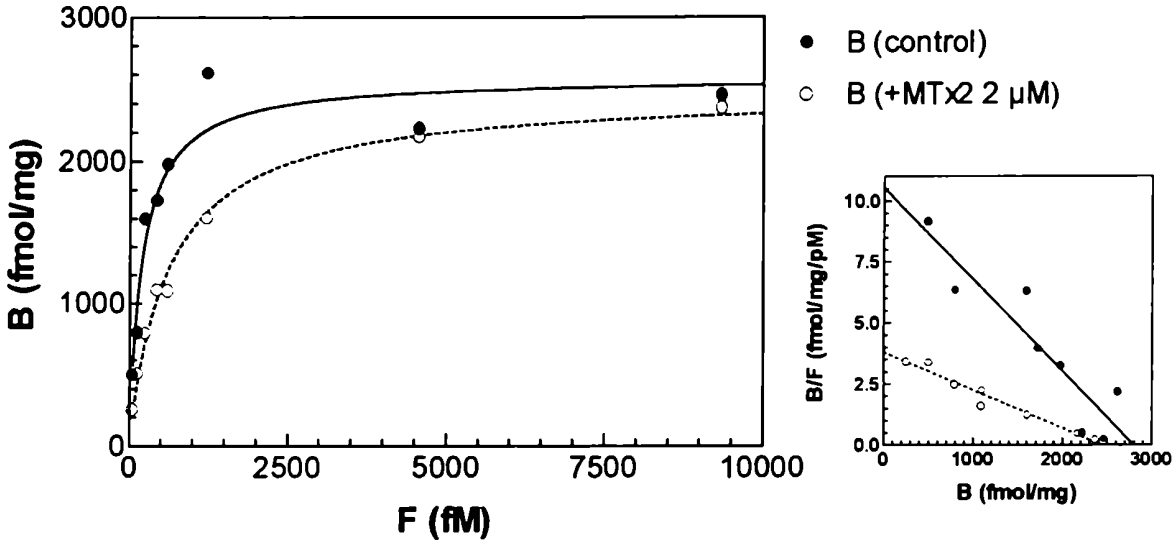


Figura III-5

Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-NMS en el subtipo m1 de receptor humano expresado en células Sf9 de insecto e incorporado en membranas artificiales, en ausencia y presencia de MTx2 (2 µM). Los valores de K_D fueron 194 pM en ausencia de MTx2 y 727 pM en presencia de MTx2. Los valores de B_{max} fueron 2.6 pmol/mg y 2.5 pmol/mg, respectivamente. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard correspondiente.

Puede verse que el efecto principal de las toxinas reside en el incremento que producen en el valor de la constante de disociación de ^{3}H-NMS, con efecto menor en el número máximo de sitios. Estas variaciones en los parámetros son congruentes con un modelo de inhibición de tipo competitivo, o incluso mixto.

Ensayos de fijación específica en receptores clonados m1, m2, m3, m4 y m5, expresados en membranas de células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus

Luego de evaluar la selectividad de las toxinas muscarínicas por el subtipo m1 con respecto al m2, resultaba necesario estudiarla con respecto a la totalidad de los subtipos conocidos de receptor muscarínico. Por entonces se habían expresado sólo cuatro subtipos, pero un tiempo después fue posible obtener los cinco subtipos (m1-m5) humanos clonados expresados en membranas de células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus.

Experimentos de inhibición:

Se realizaron curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por las toxinas MTx1 y MTx2 en los cinco subtipos de receptor muscarínico (Figuras III-6 y III-7).

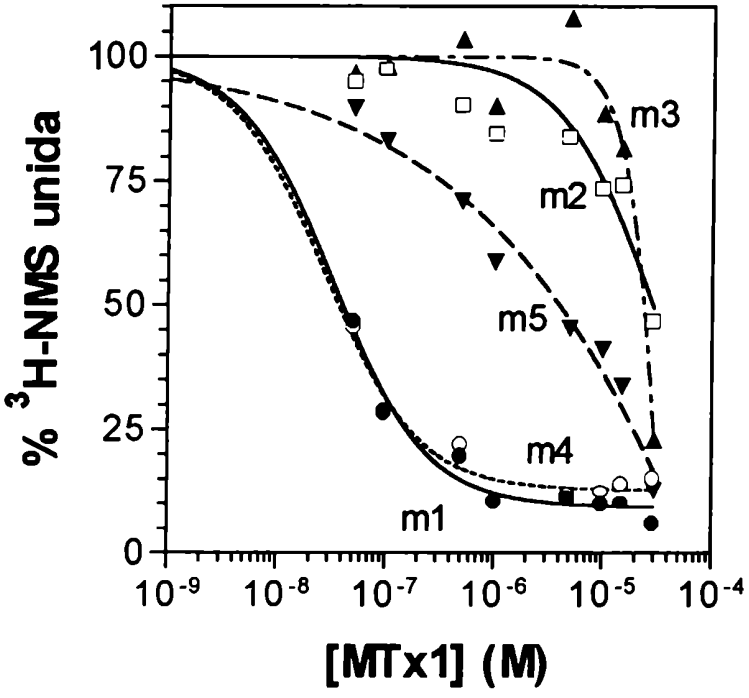


Figura III-6
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 en los subtipos de receptor m1-m5 humanos expresados en membranas de células Sf9 infectadas con baculovirus. Los valores de K_i fueron 11 nM para los receptores m1 y 10 nM para los m4, con unos pisos de 9% y 13%, respectivamente.
Los números de Hill fueron 0.96 y 1.11, cuando se ajustaron a curvas sigmoideas de pendiente variable.

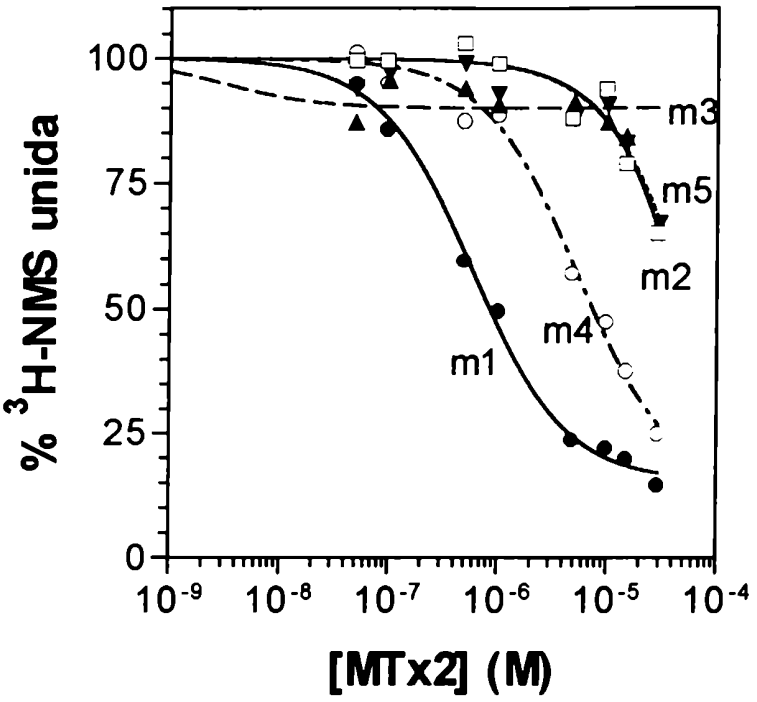


Figura III-7
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx2 en los subtipos de receptor m1-m5 humanos expresados en membranas de células Sf9 infectadas con baculovirus. Los valores de K_i fueron 211 nM para los receptores m1 y 1.97 µM para los m4, con pisos de 15% y 13%, respectivamente.
Los números de Hill fueron 0.92 y 0.80.

Tabla III-A

Valores de constantes de inhibición (media ± ESM) de las toxinas MTx1 y MTx2 al inhibir la fijación específica de ^{3}H-NMS a receptores m1 y m2. n=4-7 experimentos.

Receptor	MTx1	MTx2
m1	48 ± 9 nM	364 ± 58 nM
m4	72 ± 20 nM	1230 ± 580 nM

En estas curvas de inhibición (Figuras III-6 y III-7) puede verse la selectividad de las toxinas MTx1 y MTx2 por los subtipos m1 y m4 de receptor colinérgico muscarínico. Comparando ambos gráficos, se puede apreciar una mayor afinidad de MTx1 con relación a MTx2. Por otro lado, MTx1 parece inhibir la fijación específica de ^{3}H-NMS de manera similar en los dos subtipos, m1 y m4 (K_is = 49 y 78 nM) , mientras

que MTx2 parece discriminar entre estos dos subtipos, siendo más afín por el subtipo m1 (K_is = 364 y 1230 nM).

MTx1 muestra una afinidad intermedia por el subtipo m5, aunque el perfil de la curva de inhibición no puede ajustarse a un modelo de competición simple. Por el contrario, MTx2 no tiene efectos evidentes en los demás subtipos, aparte de m1 y m4, hasta concentraciones tan elevadas como 10 µM.

Experimentos de saturación:

Luego de realizar las curvas de inhibición de las toxinas en los subtipos m1-m5 de receptor, se procedió a estudiar el efecto de las mismas en experimentos de saturación en m1 y m4. Las Figuras III-8 y III-9 muestran curvas de saturación de la fijación de ^{3}H-NMS a receptores m1 y m4, en ausencia y presencia de MTx1, mientras las Figuras III-10 y III-11 muestran las curvas correspondientes a MTx2.

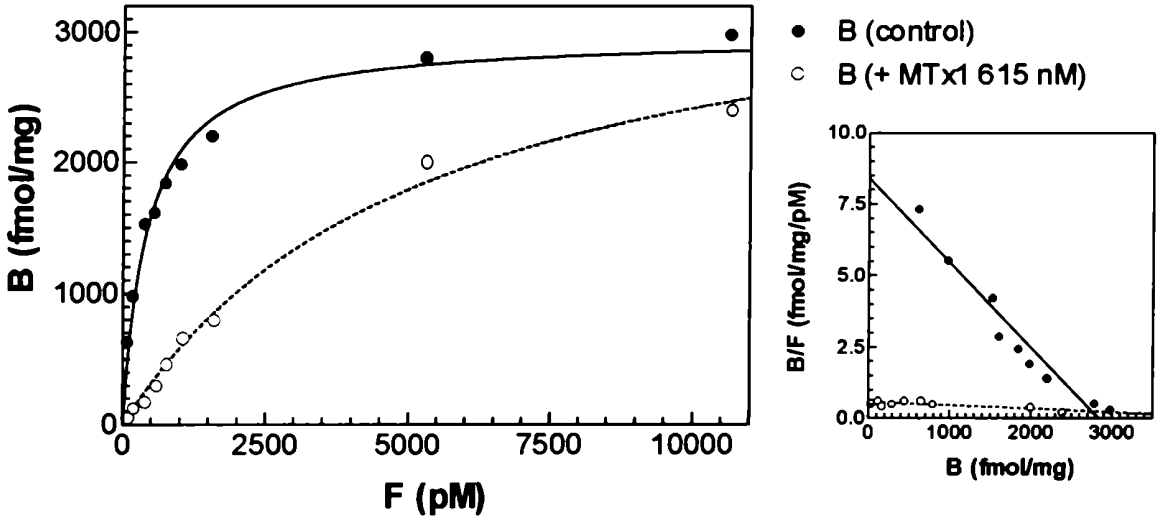


Figura III-8
Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-NMS en el subtipo m1 de receptor humano expresado en membranas de células Sf9 infectadas con baculovirus, en ausencia y presencia de MTx1 (615 nM). Los valores de K_D fueron 418 pM en ausencia de MTx1 y 5300 pM en presencia de MTx1. Los valores de B_{max} fueron 3 pmol/mg y 3.7 pmol/mg, respectivamente. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard correspondiente.

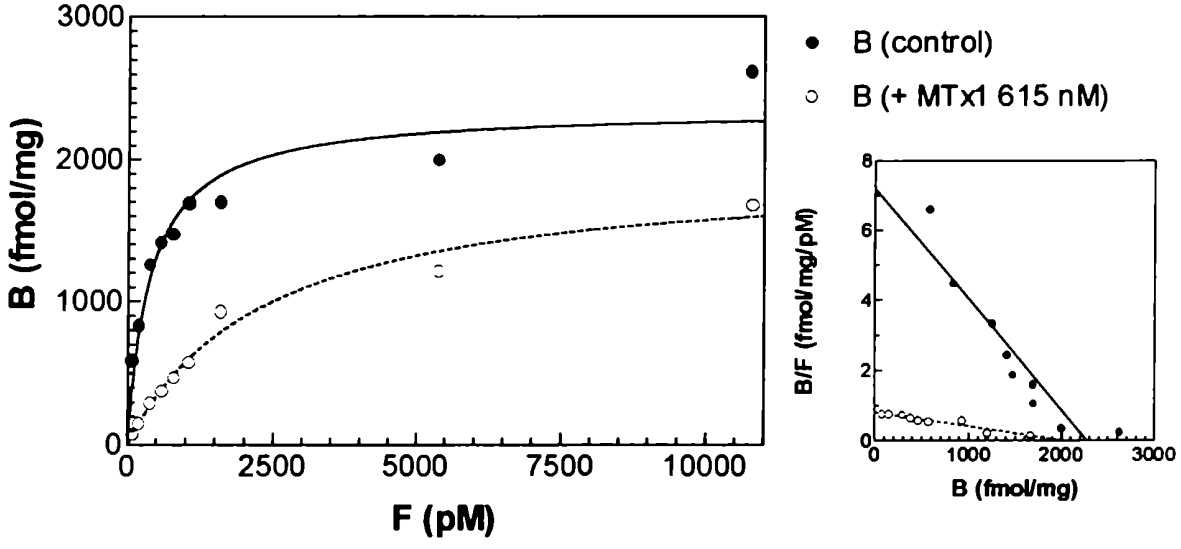


Figura III-9
Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-NMS en el subtipo m4 de receptor humano expresado en membranas de células Sf9 infectadas con baculovirus, en ausencia y presencia de MTx1 (615 nM). Los valores de K_D fueron 387 pM en ausencia de MTx1 y 2300 pM en presencia de MTx1. Los valores de B_{max} fueron 2.4 pmol/mg y 2.3 pmol/mg, respectivamente. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard correspondiente.

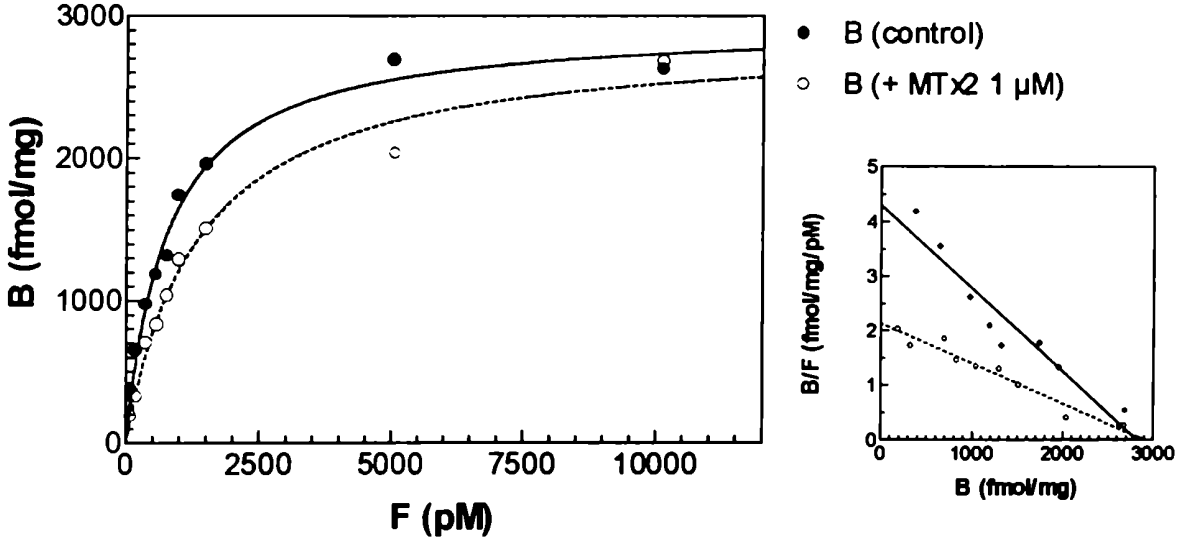


Figura III-10
Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-NMS en el subtipo m1 de receptor humano expresado en membranas de células Sf9 infectadas con baculovirus, en ausencia y presencia de MTx2 (1 μM). Los valores de K_D fueron 758 pM en ausencia de MTx2 y 1300 pM en presencia de MTx2. Los valores de B_{max} fueron 2.9 pmol/mg y 2.9 pmol/mg, respectivamente. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard correspondiente.

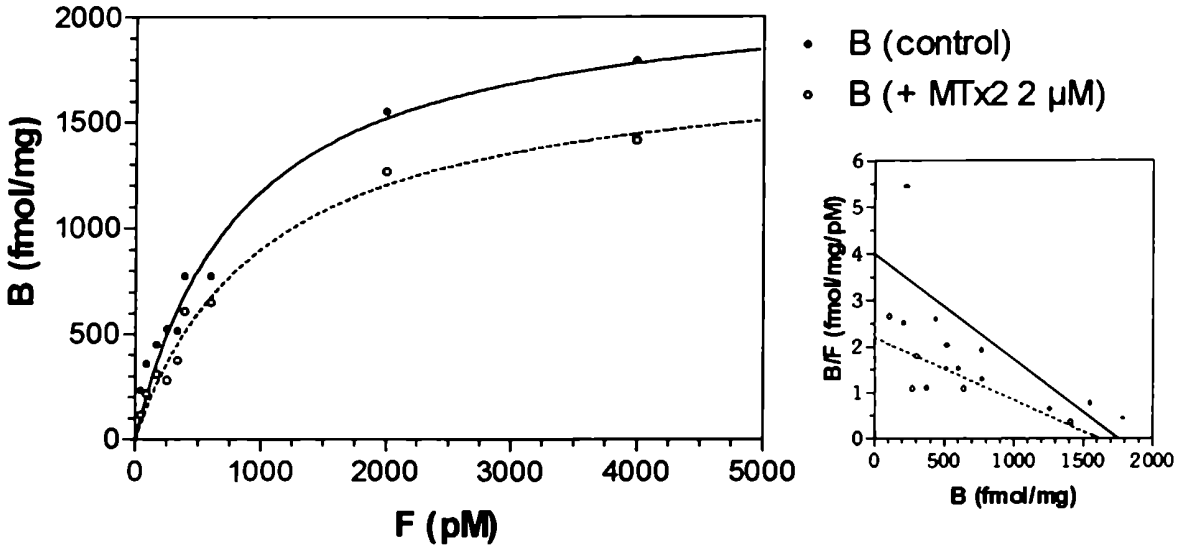


Figura III-11

Curvas de saturación de la fijación específica de ^{3}H-NMS en el subtipo m4 de receptor humano expresado en membranas de células Sf9 infectadas con baculovirus, en ausencia y presencia de MTx2 (2 μM). Los valores de K_D fueron 832 pM en ausencia de MTx2 y 1010 pM en presencia de MTx2. Los valores de B_{max} fueron 2.1 pmol/mg y 1.8 pmol/mg, respectivamente. A la derecha se muestra el gráfico de Scatchard correspondiente.

Al igual que en los experimentos homólogos mostrados anteriormente con los receptores expresados en células Sf9 e incorporados en membranas artificiales, el efecto principal de las toxinas reside en el incremento que producen en el valor de la constante de disociación aparente de ^{3}H-NMS, con efecto menor en el número máximo de sitios. Un modelo de inhibición competitiva responde a esta fenomenología.

EXPERIMENTOS CINÉTICOS

Evaluación de la reversibilidad de la unión de las toxinas

Curvas de asociación:

Los resultados obtenidos en los ensayos fisiológicos de conducto deferente de conejo (ver el capítulo IV) sugirieron que las toxinas tenían una acción persistente, que no desaparecía al cabo de varios lavados de la preparación. Por ello decidimos estudiar el comportamiento de las toxinas en ensayos de fijación específica. Al igual que en las membranas de corteza cerebral, realizamos experimentos que nos permitieran determinar la posible irreversibilidad de las toxinas en su unión al receptor muscarínico. Para ello preincubamos a los receptores con las toxinas y, luego de centrifugar para eliminar la toxina no unida, los resuspendimos y realizamos curvas de asociación de la fijación de ^{3}H-NMS (para más detalles ver sección Materiales y Métodos).

Las Figuras III-12 y III-13 muestran las curvas de asociación de ^{3}H-NMS realizadas en estas condiciones. Puede observarse que el hecho de haber preincubado los receptores con las toxinas, redujo la capacidad de unión de ^{3}H-NMS en magnitudes compatibles con las observadas en los experimentos de equilibrio. Dicha inhibición parece estable hasta al menos 90 min. después de la resuspensión de los receptores en un medio libre de toxina. Estos resultados sugieren que las toxinas MTx1 y MTx2 se unen irreversiblemente o con una cinética muy lenta de disociación al subtipo m1 de receptor muscarínico.

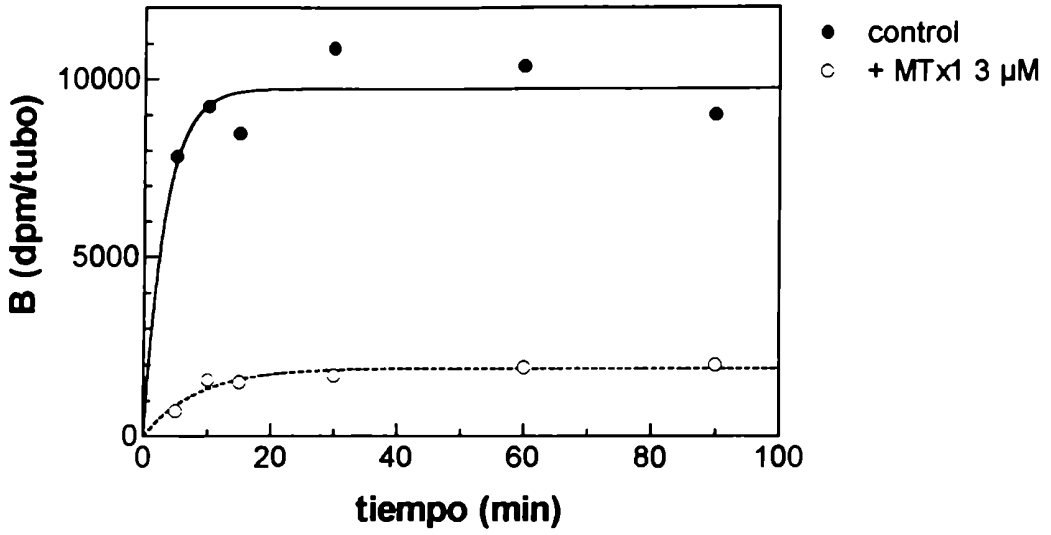


Figura III-12

Prueba de la reversibilidad de la unión de la toxina MTx1 en el subtipo de receptor m1. Los receptores fueron incubados con MTx1 3 μM, luego de lo cual fueron centrifugados para eliminar la toxina libre, luego resuspendidos en buffer con ^{3}H-NMS y filtrados a tiempos variables. Se muestra el curso temporal de la fijación de ^{3}H-NMS. Los receptores preincubados con MTx1 llegaron hasta un 20% de los controles, preincubados sin toxina. Los $T_{1/2}$ fueron 2.25 min. en los controles y 5.75 min. en los tratados con MTx1.

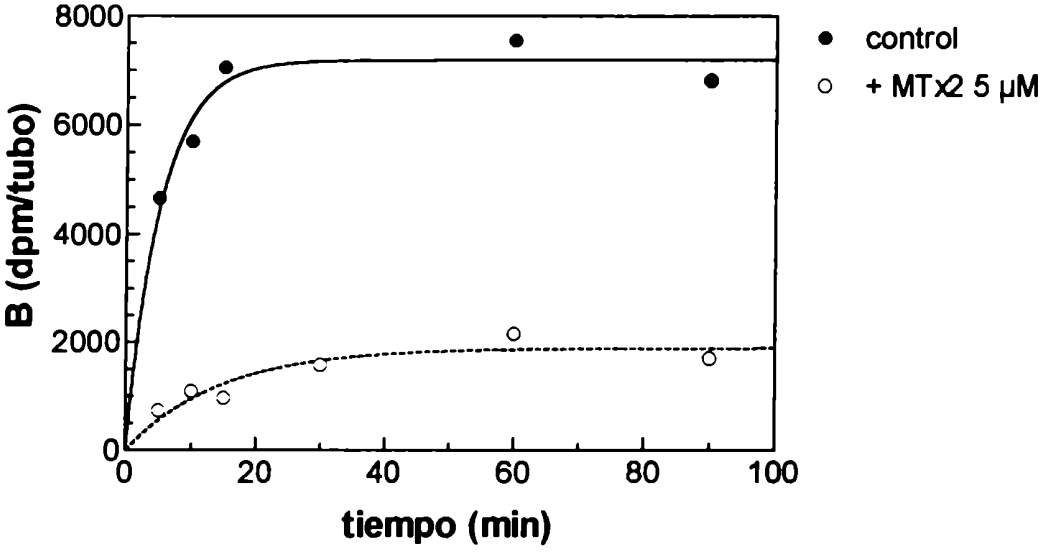


Figura III-13

Prueba de la reversibilidad de la unión de la toxina MTx2 en el subtipo de receptor m1. Los receptores fueron incubados con MTx2 5 μM, luego de lo cual fueron centrifugados para eliminar la toxina libre, luego resuspendidos en buffer con ^{3}H-NMS y filtrados a tiempos variables. Se muestra el curso temporal de la fijación de ^{3}H-NMS. Los receptores preincubados con MTx2 llegaron hasta un 26% de los controles, preincubados sin toxina. Los $T_{1/2}$ fueron 3.60 min. en los controles y 9.97 min. en los tratados con MTx2.

De la misma forma que lo visto para los receptores m1, MTx1 también mostró un carácter irreversible en su unión a los receptores m4. La preincubación de receptores m4 clonados con MTx1 1 μM, produjo un decremento de un 70% en la unión de ^{3}H-NMS luego de 30 min de incubación con el radioligando, y un 55% luego de 90 min. En una preincubación con 5 μM de MTx1, luego de 60 min se vió un decremento de un 80% en la unión de ^{3}H-NMS.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO III

Se han clonado hasta el momento cinco genes que codifican para receptores colinérgicos muscarínicos (Kubo y col., 1986a; Bonner y col., 1987; Bonner, 1989; Hulme y col., 1990, 1991). No obstante la existencia de estos subtipos estructurales, los estudios funcionales investigando los roles de los subtipos de receptor han fallado en numerosas ocasiones, debido a la carencia de agentes farmacológicos que actuasen con la suficiente selectividad sobre subtipos discretos (ver Caulfield, 1993).

Los experimentos mostrados en el presente capítulo se realizaron en receptores muscarínicos clonados obtenidos de fuentes distintas. En una primera instancia y en orden cronológico conseguimos los primeros subtipos clonados, m1 y m2, incorporados en membranas lipídicas artificiales. Tiempo después pudimos tener acceso a los cinco subtipos conocidos, expresados en membranas de células Sf9. Los resultados obtenidos en cuanto a selectividad de las toxinas fueron básicamente los mismos, en ambos casos, para estos dos subtipos.

Las curvas de inhibición mostradas en las Figuras III-1, III-2 y III-3 muestran la selectividad de las toxinas MTx1 y MTx2 por el subtipo m1 de receptor, en comparación con el m2. Ambas toxinas inhiben la fijación del radioligando muscarínico ^{3}H-QNB al subtipo m1 pero en ninguna medida al m2, por lo menos hasta una concentración de 10 μM, la mayor utilizada. MTx1 mostró poseer mayor afinidad que MTx2 por los receptores m1 (Ki = 123 nM y 891 nM, respectivamente). Como comparación son mostradas las curvas de inhibición de dos antagonistas muscarínicos clásicos: atropina (no selectivo) y pirenzepina (parcialmente selectivo por el subtipo m1) (Hammer y col., 1980; Hammer y Giachetti, 1982). Se puede apreciar que la atropina exhibe un patrón de inhibición similar en ambos subtipos, mientras la pirenzepina muestra su

selectividad por el subtipo m1. Este antagonista ha sido, hasta el momento, el más selectivo utilizado en farmacología, y presenta, aproximadamente, una diferencia de afinidad de 20 veces entre los subtipos m1 y m2. Las toxinas MTx1 y MTx2, evidentemente, superan este valor de selectividad.

Los experimentos de saturación, mostrados en las Figuras III-4 y III-5, indican que el efecto principal de las toxinas es sobre la afinidad mas que sobre el número máximo de sitios. Por lo tanto, la interacción respondería a un tipo de inhibición competitivo.

Los resultados que obtuvimos con los receptores expresados en membranas de células Sf9 (BioSigual Inc.) fueron cualitativamente los mismos para los subtipos m1 y m2. Es de notar las diferencias en los valores de K_i obtenidos entre las dos preparaciones de receptores. Si bien las toxinas exhibieron selectividad por el subtipo m1, comparado con el m2, los valores de K_i resultaron menores en este caso. Esta diferencia cuantitativa podría deberse a que en la primera preparación fue utilizado el radioligando ^{3}H-QNB, el cual posee un carácter más lipofílico que el utilizado en la segunda serie de experimentos, ^{3}H-NMS. Si se tiene en cuenta que la primera preparación consistió en receptores incorporados en liposomas artificiales, esto podría explicar que las toxinas inhibieran con menor afinidad al radioligando ^{3}H-QNB, por ser más difícil el acceso de las toxinas a zonas hidrofóbicas a las cuales se uniría ^{3}H-QNB.

Las curvas de saturación realizadas en presencia de las toxinas mostraron, al igual que en el capítulo anterior, que MTx1 y MTx2 afectan en mayor medida a los valores de afinidad, mas que al número máximo de sitios, de los radioligandos ^{3}H-QNB y ^{3}H-NMS en los receptores m1 y m4 (Figuras III-4, III-5, III-8, III-9, III-10 y III-11). Al incrementar el valor de constante de inhibición aparente sin afectar en mayor

medida el número máximo de sitios de unión, las toxinas se comportarían como antagonistas competitivos para los receptores m1 y m4.

La ausencia de interacción que pueda considerarse específica, con concentraciones no muy altas de las toxinas, con los receptores m2 y m3 (Figuras III-6 y III-7) confirma los resultados mostrados en el capítulo anterior, en membranas de tallo cerebral (con alto contenido de receptores M_2, Figura II-3, capítulo II) y páncreas (casi exclusivamente receptores M_3, Figura II-15, capítulo II). Los receptores del subtipo m5 no son expresados en forma predominante en ninguna estructura cerebral o periférica (Vilaró y col., 1994; Caulfield, 1993; Reever y col., 1997), por lo tanto no fue posible confirmar el efecto inhibitorio débil por parte de MTx1 en m5 (Figura III-6) en receptores nativos.

Dado que MTx1 y MTx2 inhiben la fijación de radioligandos muscarínicos a los receptores de los subtipos m1 y m4 —MTx2 lo hace más selectivamente por el m1, pero con menor afinidad (Figuras III-6 y III-7)—, es posible interpretar los resultados obtenidos en el capítulo anterior, sobre receptores nativos. La diferencia observada entre las inhibiciones por parte de MTx1 y MTx2 en los receptores de estriado (Figura II-14, capítulo II) es explicada por la mayor selectividad de MTx2 por el subtipo m1, asumiendo que el subtipo m4 estaría presente en una alta proporción en esta estructura.

De la misma forma que en el capítulo anterior, los experimentos de preincubación con las toxinas, lavado y luego asociación del radioligando dan una idea de la reversibilidad de la fijación de las toxinas al receptor. Los gráficos de las Figuras III-12 y III-13 muestran que la preincubación con MTx1 y MTx2 produce un decremento en la capacidad de unión específica de ^{3}H-NMS a los receptores muscarínicos clonados

del subtipo m1, siendo los valores de estado estacionario compatibles con los obtenidos en los experimentos de inhibición en equilibrio. ^{3}H-NMS mostró, asimismo, una cinética de unión similar cuando las membranas fueron preincubadas en ausencia y presencia de MTxs, por lo tanto, podríamos decir que este radioligando se une a los receptores a los que las moléculas de toxina no se unieron, en una forma convencional. Lo mismo pudo verse en receptores m4, cuando se preincubaron con MTx1. El hecho de incubar largos tiempos (90-120 min) y no observar una recuperación de la unión de ^{3}H-NMS hacia los valores controles lleva a pensar que las toxinas tendrían una fijación al receptor muscarínico de tipo irreversible o con una cinética muy lenta de disociación.

Capítulo IV

Experimentos fisiológicos

La estimulación de receptores muscarínicos induce una variedad de cambios en conductancias iónicas de membrana en diferentes tipos celulares. Por ejemplo, ellos pueden activar conductancias catiónicas, activar o inhibir conductancias de potasio, activar o inhibir conductancias de cloro, o reducir conductancias de calcio activadas por voltaje (para revisiones ver North, 1989; Skok y col., 1989; Caulfield, 1993; Méry y col., 1997; Bolton y Zholos, 1997; Brown y col., 1997). La razón de esta variabilidad es que existen cinco subtipos genéticos de receptor muscarínico, que pueden acoplarse a distintos sistemas de proteínas G en distintos tipos celulares y así influenciar distintos canales iónicos.

Las toxinas muscarínicas se comportaron como agonistas colinérgicos muscarínicos, facilitando la consolidación de una memoria aversiva (ver más adelante, en este capítulo). Las toxinas también estimularon la liberación de acetilcolina dependiente de calcio en sinaptosomas de hipocampo de rata e incrementaron la respuesta a la estimulación por alto potasio (Jerusalinsky y col., 1992b). Si ambos fenómenos estuvieran relacionados, y las MTxs actuaran a través de receptores colinérgicos muscarínicos presinápticos, aumentando el influjo de calcio a los terminales, esto podría ser detectado en ensayos de captación de $^{45}Ca^{2+}$, por ejemplo por sinaptosomas. Se sabe que el agonista carbacol cambia la curva de activación de canales de calcio dependientes de voltaje en células de músculo liso bronquial (Kamishima y col., 1992), aunque también puede inhibir canales de calcio dependientes del voltaje en células GH_3 (Offermanns y col., 1991), así como también lo hace la oxotremorina-M en neuronas simpáticas (Mathie y col., 1992).

Ensayos de estimulación por alto potasio:

En una primera etapa se puso a punto la técnica de captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas de estructuras del sistema nervioso central, como corteza cerebral e hipocampo. Se utilizó finalmente la que se describió en la sección Materiales y Métodos.

En una etapa posterior se hicieron curvas de captación de $^{45}Ca^{2+}$ debida a la estimulación por alto K^+, comprobándose la dependencia de las concentraciones de K^+ y la tendencia a la saturación del sistema, como se muestra en la Figura IV-1.

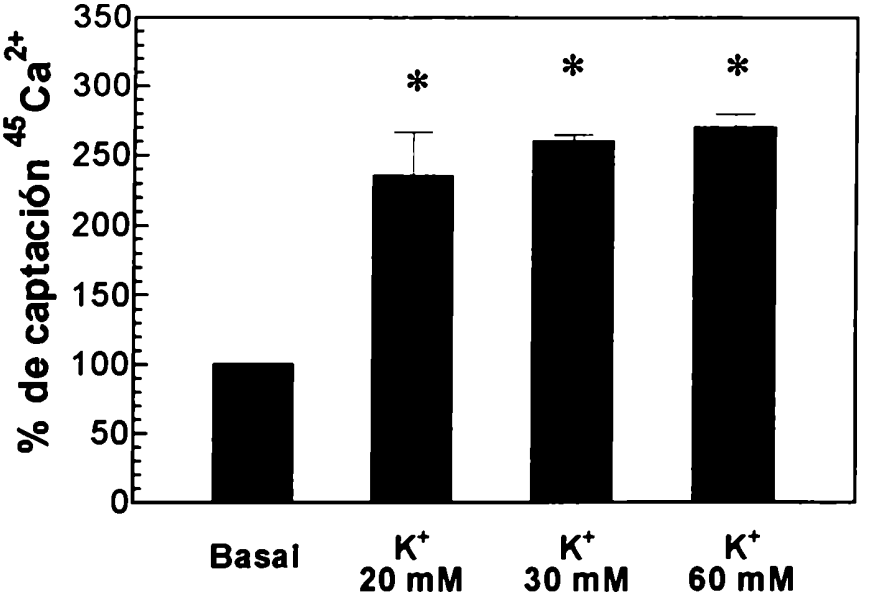


Figura IV-1
Diagrama de barras que representan la captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas de corteza cerebral de rata como porcentaje de los valores controles (basales). Puede verse la estimulación en la captación por efecto de una alta concentración de K^+ y que este efecto tiende a saturarse por encima de 30 mM. El asterisco representa diferencias significativas respecto de los valores basales. n = 2-5 experimentos.

Experimentos preliminares mostraron que el antagonista muscarínico clásico atropina inhibe, en forma dosis-dependiente, la captación de $^{45}Ca^{2+}$ estimulada por K^+ (Figura IV-2). Sin embargo, la acción de la atropina sobre la captación basal de $^{45}Ca^{2+}$ parece más compleja y no se ha esclarecido aún, además requiere estudios más detallados.

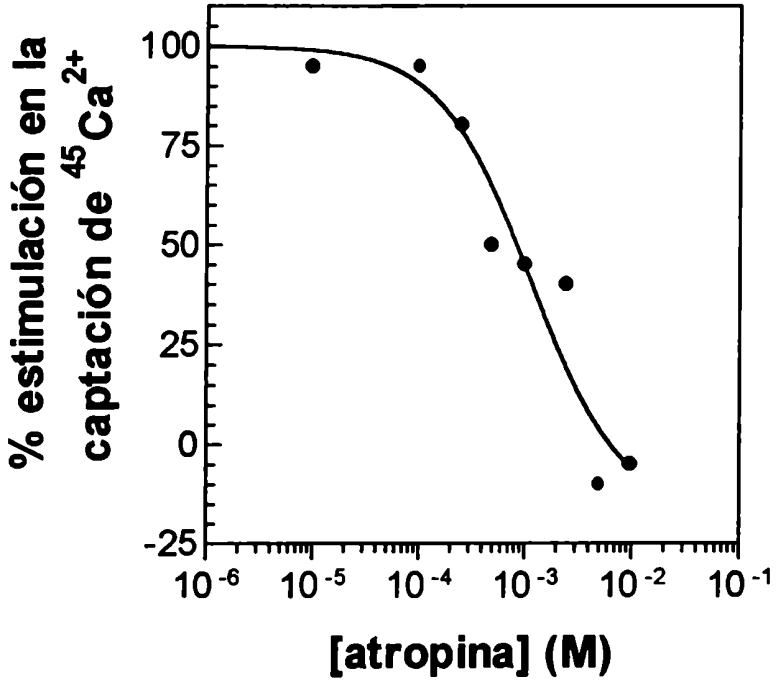


Figura IV-2
Curva dosis-respuesta del efecto del antagonista muscarínico atropina sobre la estimulación de la captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas de corteza cerebral. La atropina, a altas concentraciones, fue capaz de inhibir completamente la estimulación de la captación.

Continuando con la caracterización de este sistema, resultados preliminares indicaron que el agonista colinérgico muscarínico carbacol no modifica la captación

basal de $^{45}Ca^{2+}$, pero aumenta hasta un 100% la captación estimulada por K^+ 30 mM. El antagonista atropina revirtió este efecto (Figura IV-3).

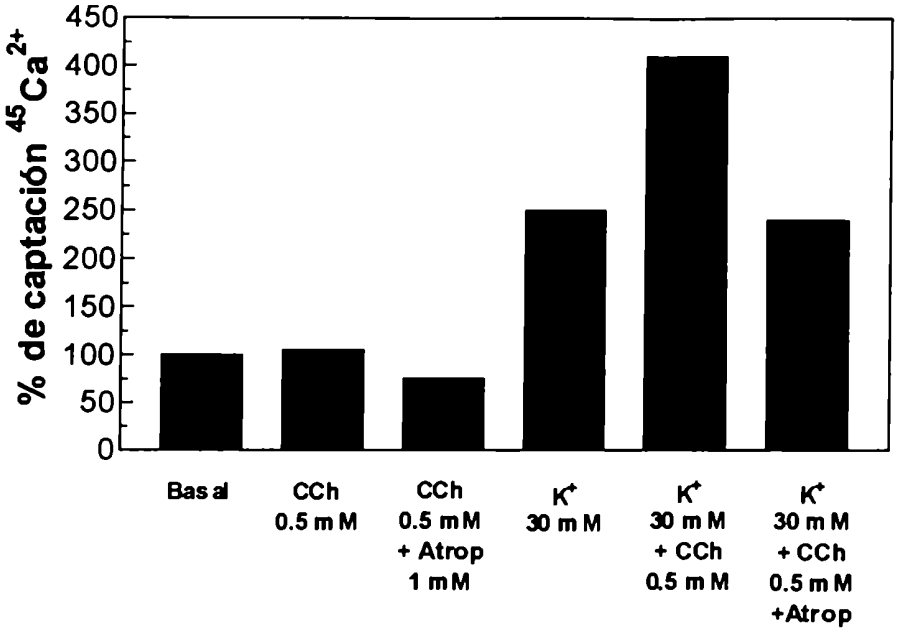


Figura IV-3
Diagrama de barras que representan la captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas de corteza cerebral de rata como porcentaje de los valores controles (basales). El agonista colinérgico carbacol (CCh) 0.5 μM no afectó la captación basal, al igual que ambas toxinas, e incrementó como MTx1 la captación estimulada por K^+ 30 mM en aproximadamente un 100%, el efecto fue revertido por atropina.

Por el contrario, otro agonista muscarínico, McN-A 343 —que posee mayor afinidad por el subtipo M_1 de receptor— inhibió tanto la captación basal (-24%) como la estimulada por K^+ 30 mM (-64%), en las mismas concentraciones en que el carbacol provocó incremento. Además pudimos observar que la inhibición por McN-A 343 es dependiente de la dosis del agonista (Figura IV-4). Este efecto fue parcialmente revertido por el antagonista pirenzepina (PZ), que también posee mayor afinidad por el subtipo M_1 de receptor muscarínico (PZ 10 μM revirtió en un 40% la acción de McN-A 343, 500 nM).

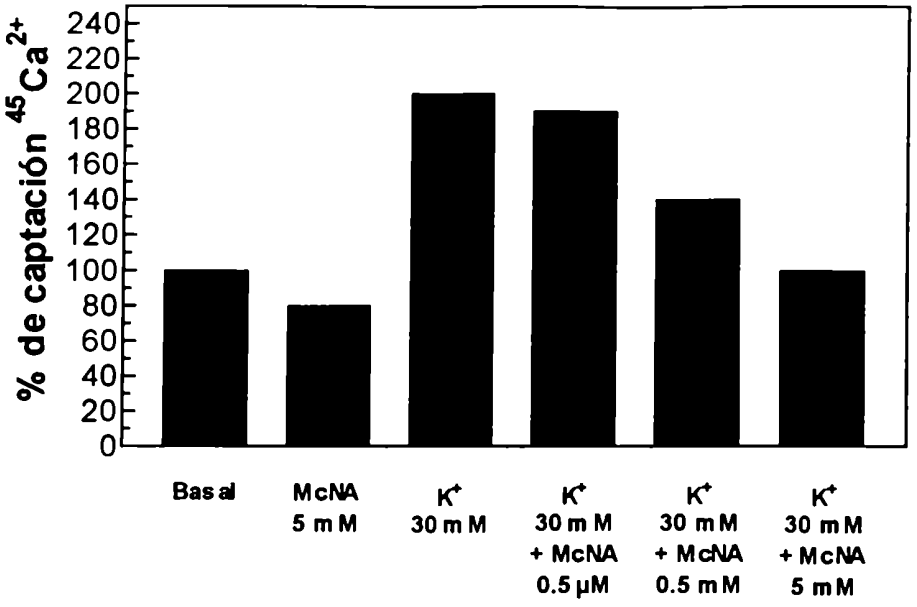


Figura IV-4
Diagrama de barras que representan la captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas de corteza cerebral de rata como porcentaje de los valores controles (basales). El agonista muscarínico McN-A 343 500 µM no afectó la captación basal pero disminuyó en una manera dosis-dependiente la captación estimulada por K^+ 30 mM.

Ensayos con las toxinas muscarínicas:

Los ensayos realizados con la toxina MTx2 mostraron que ésta no pareció afectar la captación basal, con una ligera tendencia a disminuir la captación estimulada por K^+ 60 mM, observándose una disminución de un 10%, que no fue estadísticamente significativa.

Por su parte, la otra toxina estudiada, MTx1, tampoco parece afectar la captación basal, pero sí mostró un claro aumento de la captación estimulada por K^+ 30 mM. El antagonista atropina, en las condiciones de estos ensayos, no inhibió dicho aumento en la captación (Figura IV-5).

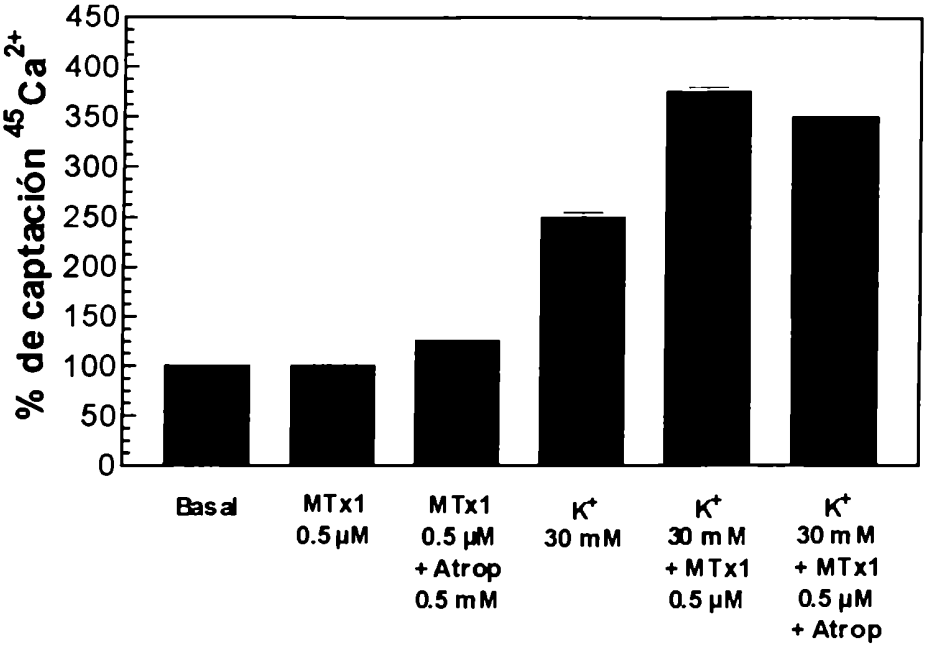


Figura IV-5
Diagrama de barras que representan la captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas de corteza cerebral de rata como porcentaje de los valores controles (basales). MTx1 0.5 µM no afectó la captación basal, al igual que MTx2, pero incrementó la captación estimulada por K^+ 30 mM en aproximadamente un 100%, efecto que no fue revertido por atropina. n = 1-3 experimentos.

Ensayos en aurícula de cobayo

Este órgano, inervado por fibras parasimpáticas postglanglionares, presenta modulación muscarínica, a través de receptores del subtipo M_2. Las acciones de la acetilcolina consisten en inhibir las actividades intrínsecas eléctrica y mecánica del músculo estriado cardíaco.

La presencia de MTx1, hasta una concentración de 1.4 μM, no afectó la frecuencia ni la fuerza de las contracciones. Luego de diez minutos de incubación con MTx1, no se modificaron las respuestas a la acetilcolina agregada exógenamente.

Ensayos en íleo de cobayo

En el íleo de cobayo, la neurotransmisión colinérgica se encuentra involucrada en la regulación de la contracción del músculo liso asociado. La acetilcolina produce contracción actuando sobre receptores, posiblemente del subtipo M_3 postsinápticos. Se ha postulado la existencia de receptores presinápticos que modularían la liberación de acetilcolina, aunque los mecanismos involucrados no están aún esclarecidos (Kawashima y col., 1990; Soejima y col., 1993).

MTx1, a concentraciones entre 1.4 y 2.8 μM, no causó contracciones en la preparación de íleo, y no afectó en forma evidente la sensibilidad de las preparaciones a la acetilcolina. MTx2, a concentraciones 0.01-0.8 μM, no causó contracciones, y no afectó significativamente las respuestas al carbacol.

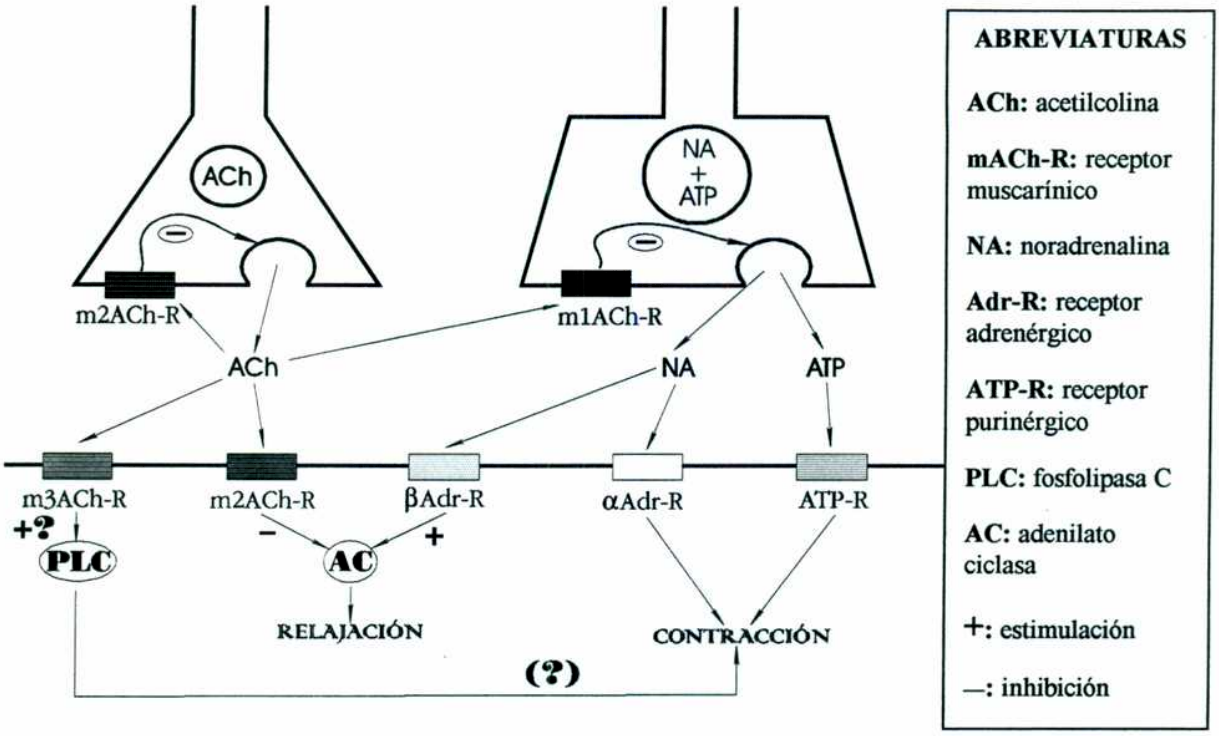
Ninguna de las dos toxinas (hasta una concentración de 0.8 μM) afectó las respuestas fásicas a la estimulación eléctrica transmural: las respuestas fueron 98 ± 9% (n=4) y 92 ± 6% (n=4) respecto al control, luego de 10-15 min de exposición a MTx1 y MTx2, respectivamente.

Antecedentes y objetivos:

El conducto deferente de conejo, a diferencia del de rata, posee una importante regulación colinérgica muscarínica. Aún no está claramente caracterizada la composición de los subtipos de receptores involucrados. Los sistemas de neurotransmisión responsables de la contracción de este músculo liso son: el purinérgico, con el ATP como neurotransmisor principal, y el adrenérgico, con la noradrenalina como neurotransmisor. Ambos, ATP y noradrenalina, son excitatorios y llevan a la contracción del músculo liso. Los receptores muscarínicos, en esta preparación, estarían cumpliendo un rol modulador de la función de contracción muscular, principalmente cumplida por los otros dos sistemas de neurotransmisión (ver Esquema). La composición de subtipos de receptores muscarínicos aún no está muy claramente dilucidada, aunque fue postulado un receptor muscarínico M_1 presináptico con capacidad de ejercer inhibición presináptica sobre los terminales adreno-purinérgicos (ver Esquema siguiente).

ESQUEMA

Diagrama de la posible configuración bioquímica de las sinapsis en conducto deferente de conejo



Experimentos con las toxinas muscarínicas:

La estimulación eléctrica produce contracciones fásicas repetidas que fueron deprimidas por los agonistas muscarínicos McN-A 343, en concentraciones superiores a 0.1 μM, y por CPCP por encima de 10 nM (Figuras IV-6 y IV-8); ambos agonistas son relativamente selectivos para el subtipo M_1 de receptor. Los efectos de McN-A 343 y CPCP fueron revertidos rápidamente por lavado, y bloqueados por pretratamiento con 0.1 μM de pirenzepina, como ya había sido descripto (Eltze, 1988; Eltze y col., 1988; Dörje y col., 1991b). El pA_2 para la pirenzepina *vs* McN-A 343 fue 8.15, sugiriendo que los receptores involucrados son los m1 (Dörje y col., 1991b,c).

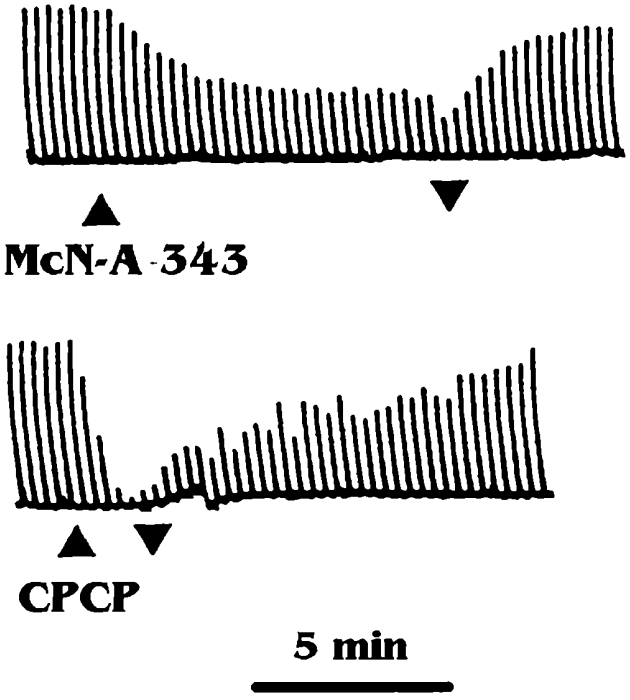


Figura IV-6
Registros de los efectos de los agonistas muscarínicos M_1 McN-A 343 y CPCP sobre las contracciones fásicas evocadas por estimulación eléctrica en conducto deferente de conejo. Las cabezas de flecha indican aplicación y lavado de la droga.

Las toxinas MTx1 (5-400 nM) y MTx2 (5-400 nM) también inhibieron las respuestas a la estimulación eléctrica (Figura IV-7). La potencia de las toxinas resultó similar a la de CPCP, y alrededor de 10 veces más potente que la de McN-A 343 (Figura IV-8). Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido con aquellos agonistas, los efectos de las toxinas fueron pobremente revertidos por lavado (Figura IV-7). A una concentración de 400 nM, MTx1 y MTx2 redujeron la respuesta fásica evocada a un 35 ± 7% y 21 ± 1% del control, respectivamente. Luego de lavar repetidamente durante un período de 240 min, las respuestas fásicas continuaron reducidas a un 33 ± 7% y 20 ± 4% del control, respectivamente (media ± ESM; n = 6 y 4).

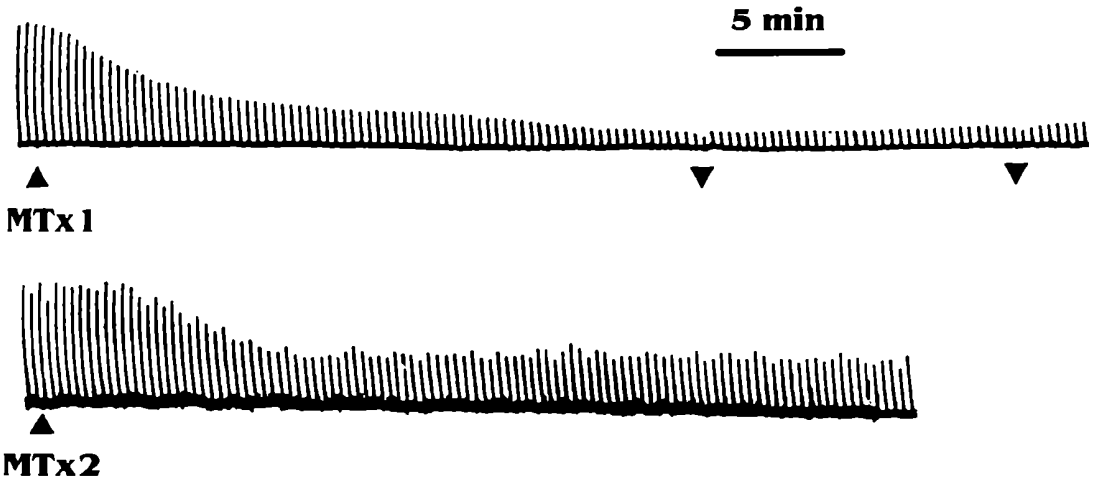


Figura IV-7
Registros de los efectos de las toxinas muscarínicas MTx1 y MTx2 sobre las contracciones fásicas evocadas por estimulación eléctrica en conducto deferente de conejo. Las cabezas de flecha indican aplicación y lavado de la toxina.

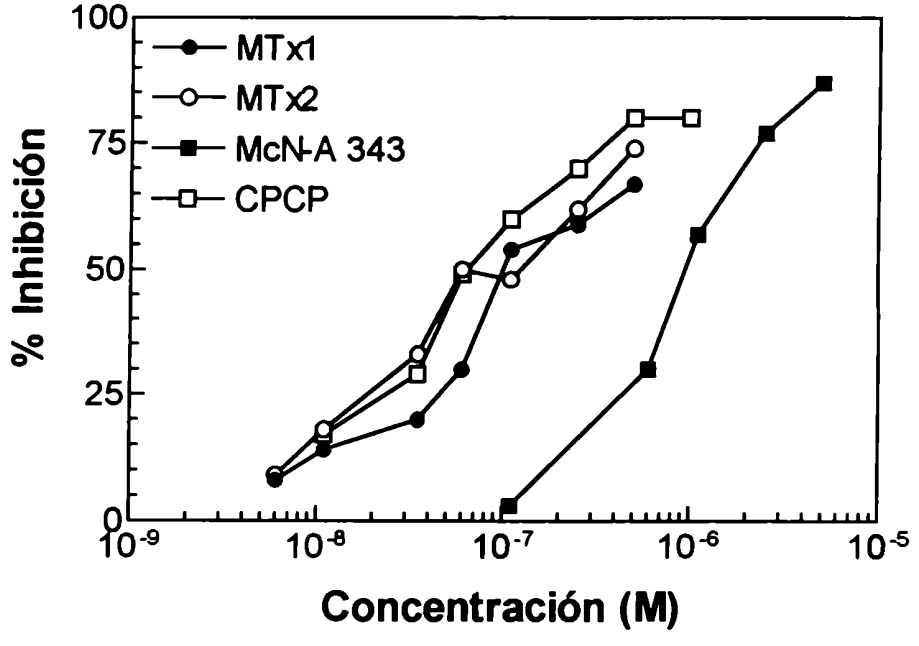


Figura IV-8
Curvas dosis-respuesta de los efectos de MTx1, MTx2, McN-A 343 y CPCP sobre las respuestas fásicas de las preparaciones de conducto deferente de conejo a la estimulación neural.
Los puntos representan las medias de 8-12 experimentos; las barras de error no se muestran, pero resultaron menores del 3%. Las drogas se agregaron en forma acumulativa.

Aunque los efectos de MTx1 y MTx2 sobre las contracciones evocadas eléctricamente fueron similares a los causados por la estimulación de los supuestos receptores M_1 presinápticos inhibitorios postulados, efectos similares podrían ser causados por bloqueo postsináptico. Entonces se testearon las sensibilidades de las preparaciones a los neurotransmisores excitatorios ATP y noradrenalina, y a la depolarización directa por alta concentración de KCl, antes y después de la aplicación de MTx1 y MTx2.

El agregado de MTx1 400 nM produjo la reducción de las respuestas fásicas evocadas, que resultaron un 35% del control. A su vez, en presencia de MTx1, la respuesta a noradrenalina (20 μM) fue de un 5%, mientras que la respuesta de contracción al ATP (4 mM) fue de un 98% y al KCl (40 mM) fue también del 98%, en relación con los controles respectivos (Figura IV-9A).

MTx2 (400 nM) tampoco tuvo efecto sobre las respuestas a ATP y KCl, y tuvo mucho menor efecto sobre la respuesta a noradrenalina. El agregado de MTx2 (400 nM) redujo la respuesta evocada a un 30% del control. Luego del agregado de MTx2 400 nM, la respuesta a noradrenalina 40 μM fue un 83% del control (Figura IV-9A). Las respuestas a la noradrenalina, pero no a la estimulación indirecta, se recuperaron luego del lavado de las MTxs: la recuperación fue casi completa luego de 240 min de lavado de MTx1 (Figura IV-9B) y luego de 15 min de lavado de MTx2. De acuerdo a lo esperado, McN-A 343 (1 μM) no tuvo efecto sobre la sensibilidad a la noradrenalina ni al ATP.

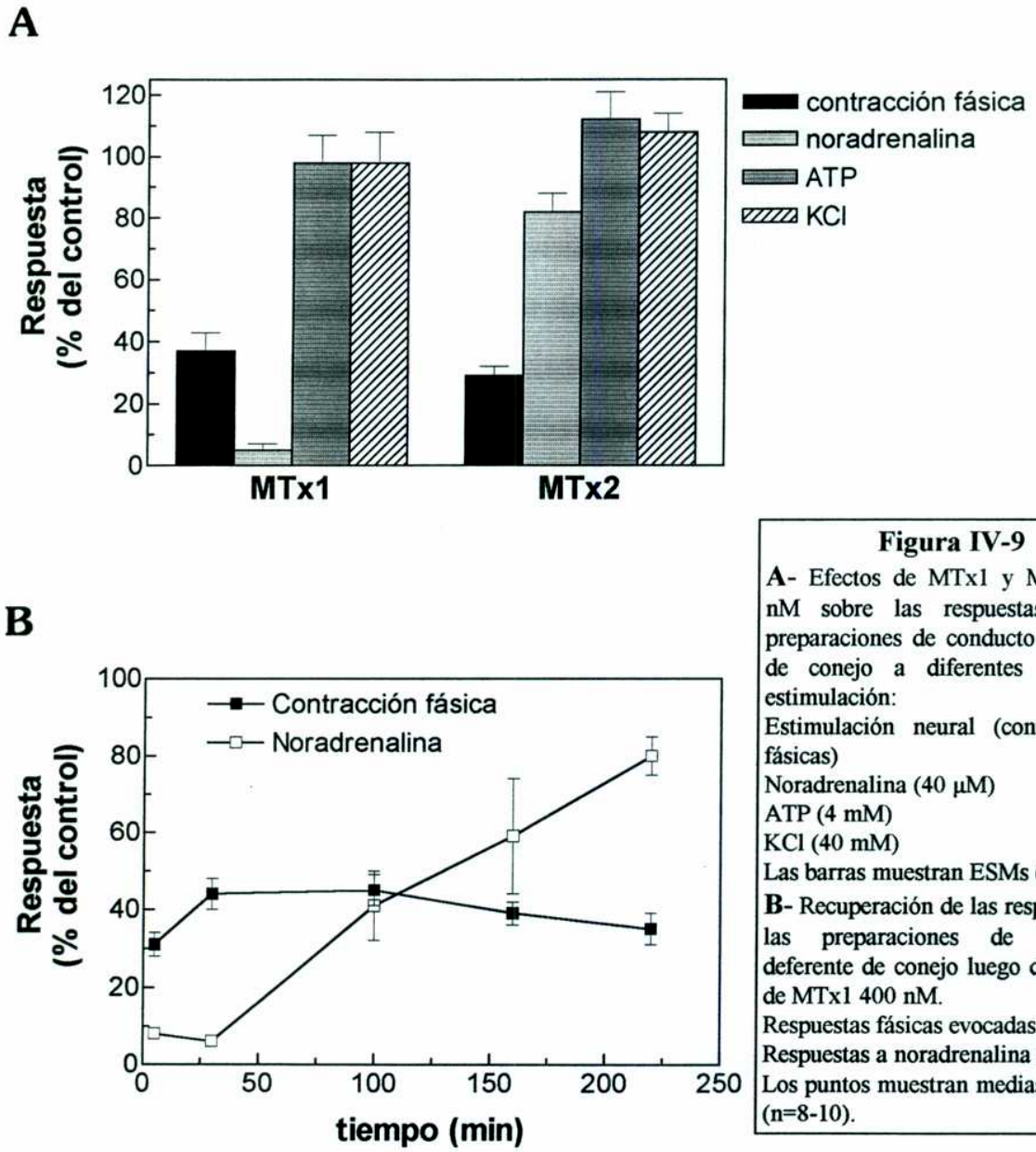


Figura IV-9

A- Efectos de MTx1 y MTx2 400 nM sobre las respuestas de las preparaciones de conducto deferente de conejo a diferentes tipos de estimulación:
Estimulación neural (contracciones fásicas)
Noradrenalina (40 μM)
ATP (4 mM)
KCl (40 mM)
Las barras muestran ESMs (n=4-8).

B- Recuperación de las respuestas de las preparaciones de conducto deferente de conejo luego del lavado de MTx1 400 nM.
Respuestas fásicas evocadas
Respuestas a noradrenalina 20 μM
Los puntos muestran medias ± ESMs (n=8-10).

Aunque el bloqueo de los receptores α_1-adrenérgicos por MTx1 podría contribuir a los efectos de bloqueo de las respuestas fásicas evocadas, no puede ser la única causa. Por ejemplo, cuando las respuestas a noradrenalina fueron suprimidas por fentolamina —antagonista α-adrenérgico— 1 μM, MTx1 redujo aún más las respuestas evocadas. De hecho, las preparaciones fueron más sensibles a MTx1 en presencia de

fentolamina (Figura IV-10). Una concentración más alta de fentolamina (10 μM) redujo los efectos de MTx1, pero esta concentración también redujo las respuestas a McN-A 343 en una medida similar (datos no mostrados).

Se realizaron experimentos similares con benextramina, bloqueante irreversible de los receptores α_1-adrenérgicos (Belleau y col., 1982). La exposición a benextramina 100 μM durante 30 min, redujo las respuestas fásicas evocadas al 48 ± 6% del control (n = 4) y suprimió las respuestas a la noradrenalina (hasta 600 μM). MTx1 (100 nM) aún redujo las respuestas evocadas en un 58 ± 8%, comparado con una reducción del control en un 49 ± 5%.

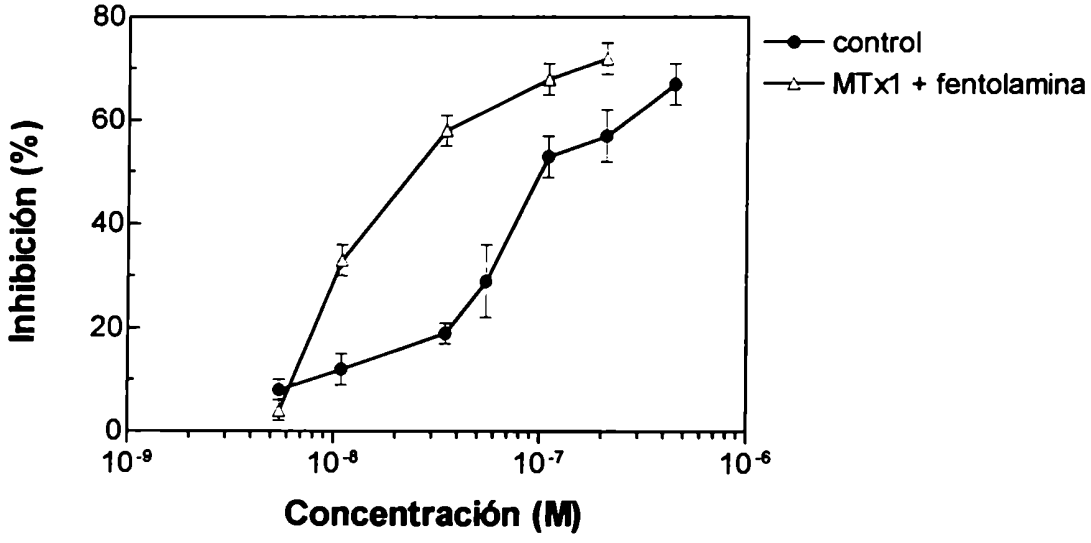


Figura IV-10
Efecto de MTx1 sobre las respuestas fásicas evocadas de la preparación de conducto deferente de conejo en presencia de fentolamina.
Respuestas control a MTx1
MTx1 en presencia de fentolamina 1 μM
Los puntos representan medias ± ESMs (n = 4).

Para verificar si las MTxs podían estar incrementando o bloqueando la regulación por retroalimentación endógena de la liberación de neurotransmisor, se realizaron experimentos con MTx1 en presencia de DPX (para bloquear receptores A_1

de adenosina presinápticos), PPADS (para bloquear los efectos facilitatorios del ATP sobre los receptores P_2-purinérgicos presinápticos) e indometacina (para prevenir la liberación de prostanoides endógenos) (ver Grimm y col., 1994a). Los efectos de MTx1 y McN-A 343 sobre las respuestas fásicas, no fueron afectados por la combinación de inhibidores: las respuestas a MTx1 (100 nM) y McN-A 343 (6 μM) fueron 60 ± 6% y 43 ± 7% de los controles apareados, comparados con los valores experimentales con los inhibidores, de 63 ± 3% y 36 ± 8%.

Conducto deferente de rata

Para examinar mejor los efectos de las MTxs sobre los receptores α_1-adrenérgicos, se realizaron experimentos en preparaciones de conducto deferente de rata, debido a que carece de receptores muscarínicos M_1 presinápticos. MTx1 a concentraciones por encima de 100 nM redujo las respuestas evocadas: con 100 nM las respuestas fueron 83 ± 4% del control, y con 800 nM las respuestas fueron 53 ± 2% del control (n = 4). MTx2 (100-800 nM) tuvo poco efecto sobre las respuestas fásicas evocadas: con 800 nM las respuestas no fueron apreciablemente diferentes respecto a las preparaciones de controles apareados.

MTx1 redujo las contracciones por noradrenalina, pero no las producidas por ATP o KCl (Figura IV-11). MTx2 no tuvo efecto sobre las contracciones por noradrenalina, ATP o KCl (Figura IV-11).

Los efectos inhibitorios de MTx1 sobre las contracciones fásicas evocadas y las respuestas a noradrenalina se revirtieron por lavado luego de 3 hs.

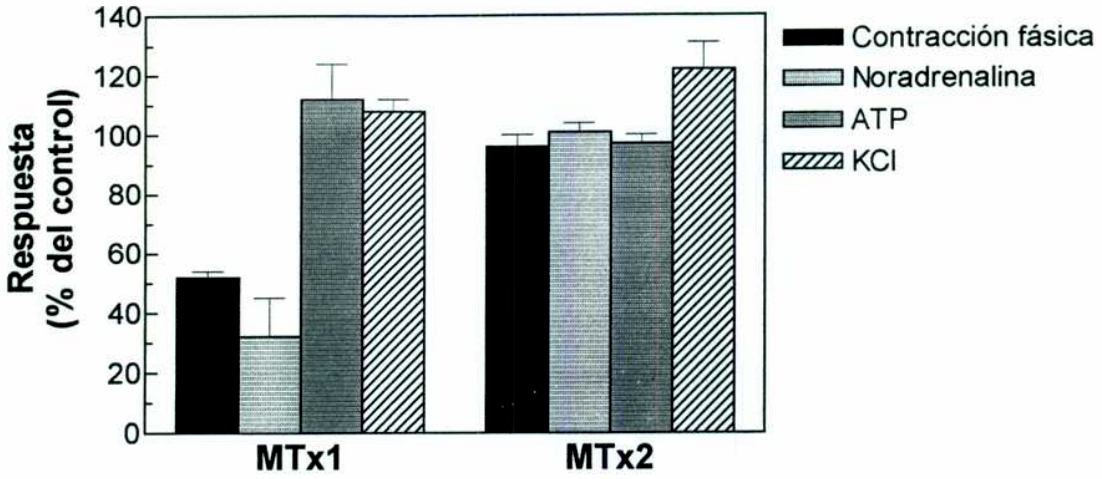


Figura IV-11
Efectos de MTx1 y MTx2 800 nM sobre las respuestas del conducto deferente de rata a distintos tipos de estimulación.
Estimulación neural (contracciones fásicas)
Noradrenalina (40 μM)
ATP (4 mM)
KCl (40 mM)
Las barras representan medias ± ESMs (n=4-8).

Efecto de las toxinas muscarínicas MTx1 y MTx2 sobre la consolidación de una memoria de evitación inhibitoria en ratas:

Luego de observar que las toxinas MTx1 y MTx2 se comportan como agonistas muscarínicos, aparentemente selectivos para el subtipo M_1 farmacológico, decidimos probar su efecto en un ensayo fisiológico más global, en donde interviene el sistema colinérgico muscarínico.

El paradigma de aprendizaje de evitamiento inhibitorio es uno de los más estudiados y más conocidos. Se conoce que la neurotransmisión colinérgica muscarínica en las estructuras límbicas involucradas, tiene participación en la consolidación de este tipo de memoria (Izquierdo y col., 1992a).

Cuando se microinyecta, inmediatamente luego del entrenamiento, el antagonista muscarínico escopolamina, en el hipocampo dorsal de ratas, produce amnesia retrógrada, tanto en la habituación a un ambiente novedoso como en el evitamiento inhibitorio en un solo paso ("step-down") (Izquierdo, 1989; Izquierdo y col., 1992a). El agonista muscarínico oxotremorina produce facilitación retrógrada de la retención de ambas tareas (Izquierdo y col., 1992a). Como se supone que los efectos de los tratamientos inmediatos al entrenamiento influyen en los procesos de consolidación, los mecanismos colinérgicos muscarínicos en el hipocampo parecen ser esenciales para la consolidación, al menos en estos tipos de memoria (Izquierdo y col., 1992a,b).

Se ensayaron las toxinas MTx1 y MTx2 con microinyecciones sobre el hipocampo dorsal, inmediatamente después del entrenamiento en una tarea de evitamiento inhibitorio "step-down", tal como se describe en Materiales y Métodos. Ambas toxinas produjeron facilitación en la consolidación de esta memoria (Figuras IV-12 y IV-13), al igual que el agonista muscarínico oxotremorina (n=12) (Figura IV-12), aunque los datos de MTx1 son preliminares (n=6). La microinyección conjunta de escopolamina revirtió los efectos de ambas toxinas (Figuras IV-12 y IV-13).

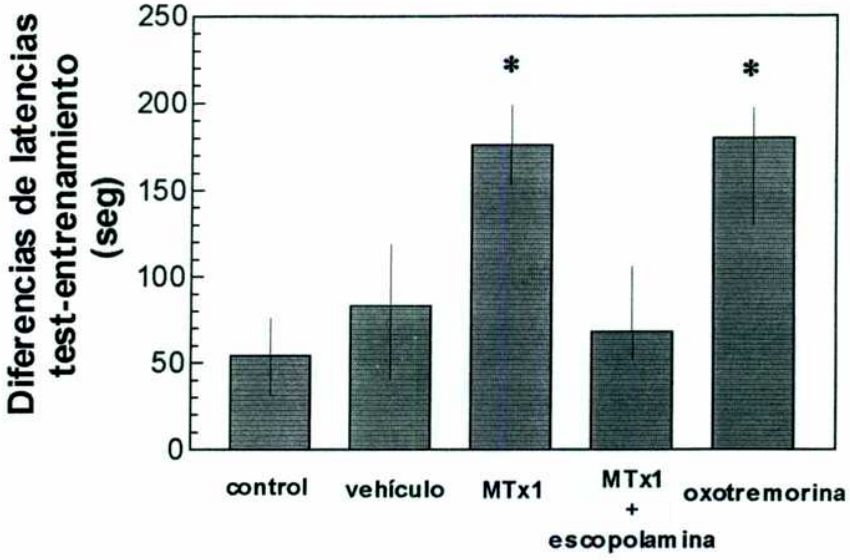


Figura IV-12

Efecto de la inyección de MTx1 en el hipocampo dorsal de ratas, inmediatamente después del entrenamiento, sobre la consolidación de la memoria en una tarea de evitación inhibitoria.

Las dosis utilizadas fueron las siguientes:

Vehículo: 0.5 µl por lado

MTx1: 1 µg por lado

MTx1 + escopolamina: 2 µg por lado

Oxotremorina: 1 µg por lado

Las ordenadas representan las diferencias entre las latencias de la sesión de test y de entrenamiento, en segundos (medianas ± rangos intercuartiles). n = 6-12 animales. *$P < 0.05$, respecto del control. "U" Mann-Whitney de dos colas.

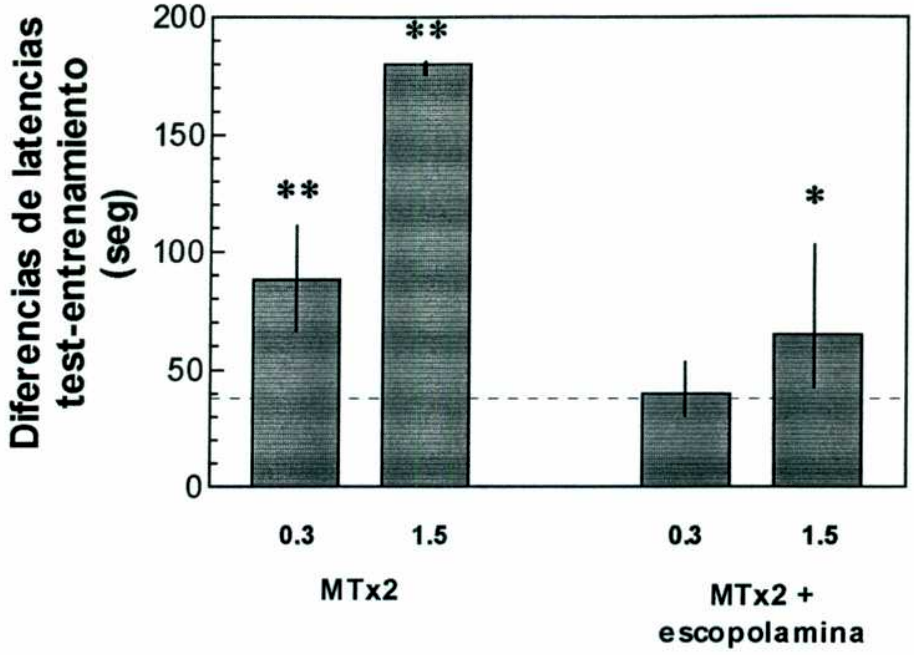


Figura IV-13

Efecto de la inyección de MTx2 en el hipocampo dorsal de ratas, inmediatamente después del entrenamiento, sobre la consolidación de la memoria en una tarea de evitamiento inhibitorio.
Las dosis utilizadas fueron las siguientes:
Vehículo: 0.5 µl por lado
MTx2: 0.3 ó 1.5 µg por lado, según lo indicado
MTx2 + escopolamina: 2 µg por lado
Las ordenadas representan las diferencias entre las latencias de la sesión de test y de entrenamiento, en segundos (medianas ± rangos intercuartiles).
La línea discontínua indica el valor de los controles. **P<0.002; *P<0.02, respecto del control. "U" Mann-Whitney de dos colas.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO IV

Aunque se ha observado la participación de los receptores muscarínicos en la modulación directa de canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, el fenómeno, no ha sido estudiado exhaustivamente, hasta el momento. La activación de receptores muscarínicos en variados sistemas celulares produce cambios en diversas conductancias iónicas de membrana (ver Skok y col., 1989; Caulfield, 1993). Con respecto a las conductancias al Ca^{2+}, se reportaron efectos opuestos entre sí. Kamishima y col. (1992) observaron efectos del agonista carbacol sobre los canales de Ca^{2+}, activables por voltaje, en células de músculo liso bronquial. Dichos efectos se reflejaron como incrementos en las corrientes de Ca^{2+}. Por el contrario, en forma independiente, Offermanns y col. (1991) y Mathie y col. (1992) reportaron la inhibición de canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje, por efectos de los agonistas carbacol y oxotremorina-M, respectivamente, en células GH_3 y neuronas simpáticas. Alternativamente, Lambert y Nahorski (1992), observaron la entrada de Ca^{2+} estimulada por carbacol en células SH-SY5Y, mediante un mecanismo de rellenado capacitivo. Asimismo, se vió que en miocitos cardíacos aislados, la activación de los receptores muscarínicos produce inhibición de la corriente de Ca^{2+}, y se comprobó que esta inhibición está mediada por la inhibición de la adenilato ciclasa, pero también por la activación de fosfatasas y la vía NO/GMPc (ver Méry y col., 1997). Como se puede apreciar, el tema es complejo como para delinear generalidades simples en cuanto a la acción de receptores muscarínicos sobre canales de Ca^{2+} (ver Brown y col., 1997 para una pequeña revisión). Por ello resultaba particularmente interesante estudiar el comportamiento del Ca^{2+} en preparaciones de sinaptosomas, con agonistas y antagonistas.

En ensayos preliminares se vió que las toxinas MTx1 y MTx2 estimulan *per se* la liberación de ^{3}H-ACh dependiente de Ca^{2+}, de sinaptosomas de hipocampo de rata, y que además incrementan la liberación de ^{3}H-ACh en respuesta a la estimulación por alto K^{+} (Jerusalinsky y col., 1992b).

Con el fin de evaluar un posible efecto de estas toxinas sobre los mecanismos de permeabilidad al Ca^{2+}, fueron realizados ensayos de captación de $^{45}Ca^{2+}$, en los cuales se pudo apreciar un aumento del ingreso de este ion en presencia de MTx1.

En nuestros ensayos de captación de $^{45}Ca^{2+}$ por sinaptosomas de corteza cerebral de rata, la atropina —antagonista muscarínico clásico— produjo inhibición, dependiente de la dosis, de la captación $^{45}Ca^{2+}$ estimulada por alto K^{+} (Figura IV-2). Por el contrario, el agonista muscarínico carbacol produjo incrementos en la captación estimulada por alto K^{+}, revirtiéndose este efecto cuando se incubó conjuntamente con atropina (Figura IV-3). Paradójicamente, el otro agonista utilizado, McN-A 343, produjo un efecto similar al de la atropina (Figura IV-4). La diferencia observada entre los efectos de carbacol y McN-A 343 requiere ulteriores ensayos para poder dilucidar los mecanismos involucrados.

Una vez caracterizado preliminarmente nuestro sistema para los efectos de agentes muscarínicos clásicos, procedimos a ensayar las toxinas muscarínicas. MTx2 no parece afectar significativamente la captación basal ni la estimulada por alto K^{+}. En cambio, MTx1 produjo efectos comparables a los del agonista carbacol con estimulación por K^{+} 30 mM (Figura IV-5), pero no con K^{+} 20mM ni 60 mM. La falta de efectos evidentes de MTx1 a esas concentraciones de K^{+} puede deberse a que el sistema se encuentra saturado con esa estimulación de 60 mM de K^{+}, mientras que con K^{+} 20 mM no se activaría lo suficiente como para ver el efecto. La coincubación con atropina no revirtió el efecto de MTx1 (Figura IV-5), posiblemente debido al carácter irreversible de la acción de esta toxina (ver experimentos en conducto deferente de conejo, en este

capítulo, y los resultados de prueba de irreversibilidad en la unión a receptores, en los capítulos II y III).

Es necesario remarcar que, si bien no se tiene un panorama claro en cuanto a las influencias directas de los receptores muscarínicos sobre conductancias al Ca^{2+}, sí se conoce bastante sobre mecanismos muscarínicos sobre distintas conductancias al K^+ en neuronas, que podrían causar los efectos vistos en nuestros experimentos, debido a que la depolarización se indujo mediante un brusco aumento en la concentración de K^+ en el medio. Se conocen ciertos canales de K^+ que pueden ser abiertos por la activación de receptores muscarínicos; entre ellos se encuentran los canales rectificadores hacia adentro ("inward rectifier", K_{ir}), y los canales de K^+ sensibles al Ca^{2+} (K_{Ca}). Los primeros son los equivalentes a los encontrados en corazón, y son activados por proteína G (ver Brown y col., 1997). Los segundos se han visto en células NG108-15 y CHO; estos canales se abren por efecto del Ca^{2+} liberado de depósitos intracelulares. Este aumento de Ca^{2+} libre intracelular es provocado por acción de IP_3 producido por la activación de receptores m1 ó m3 (ver Brown y col., 1997). Si el efecto de MTx1 estuviera mediado por la activación de canales de K^+, produciendo una mayor depolarización que en las condiciones controles y permitiendo mayor entrada de Ca^{2+} a los sinaptosomas, esto podría explicar, por lo menos en teoría, que este efecto sea visto sólo con una concentración intermedia de K^+ (30 mM), y no con bajas y altas concentraciones de K^+. Una baja concentración no permitiría apreciar un efecto de magnitud pequeña, mientras que una alta concentración saturaría el sistema.

Sin embargo, toda una línea de experimentación se abre en esta dirección, hacia un estudio más exhaustivo de la población de canales, con sus características de probables subpoblaciones con distintas particularidades de activación en este sistema.

Con las concentraciones utilizadas, no se ha puesto en evidencia ninguna acción de las MTxs en preparaciones de aurícula aislada o en íleo de cobayo, en los cuales predominan los subtipos de receptores muscarínicos M_2 y M_3, respectivamente.

La activación de los receptores muscarínicos del músculo liso longitudinal del íleo de cobayo, produce un incremento en la frecuencia de descargas de potenciales de acción y en la depolarización, lo que resulta en la contracción del músculo. Usualmente se considera que las contracciones evocadas están mediadas por el subtipo M_3 de receptor (Lambrecht y col., 1989b), y aunque el músculo posee una preponderancia de sitios de unión M_2, se considera, en general, que éstos no son funcionales (Eglen y col., 1994; Bolton y Zholos, 1997).

Hace tiempo se demostró la presencia de receptores presinápticos muscarínicos que modulan la liberación de acetilcolina por un mecanismo de retroalimentación en los terminales nerviosos del íleo de cobayo, de forma tal que los agonistas inhiben la liberación, mientras que los antagonistas muscarínicos la incrementan (Alberts y col., 1982; Fosbraey y Johnson, 1980a,b; Kilbinger, 1977, 1984, 1985; Kilbinger y Wagner, 1975; Kilbinger y Wessler, 1980; Morita y col., 1982; Szerb, 1980). Originariamente se propuso que los receptores presinápticos podían ser clasificados como del subtipo M_2 (Kilbinger, 1985), dado que, tanto los receptores pre- como postsinápticos, parecían tener afinidades similares a los antagonistas como atropina, escopolamina y pirenzepina, en las condiciones utilizadas en estudios previos (Halim y col., 1982; Kilbinger y Nafziger, 1985; Kilbinger y col., 1984). Sin embargo, posteriormente se postuló la existencia de receptores presinápticos del subtipo farmacológico M_1 en el íleo de cobayo, ya que la pirenzepina mostró una afinidad 100 veces mayor por los receptores presinápticos que por los postsinápticos (Kawashima y col., 1988, 1990). También posteriormente se postuló la existencia de receptores M_3 presinápticos, aparte de los M_1, que producirían autoinhibición y estimulación, respectivamente, de la

liberación de acetilcolina de los terminales nerviosos periféricos en ese órgano (Soejima y col., 1993). Recientemente, Dietrich y Kilbinger (1995) postularon la existencia de receptores M_1 presinápticos y receptores M_3 postsinápticos en el músculo circular del íleo de cobayo (otra capa muscular, distinta a la utilizada en este trabajo). Como puede notarse, los mecanismos involucrados en la modulación de la liberación de acetilcolina aún no se han esclarecido.

La ausencia de efecto de las toxinas que observamos en el íleo de cobayo, se encuentra en contradicción con los resultados obtenidos por el grupo de Karlsson (Karlsson y col., 1994; Jolkkonen y col., 1995a), quienes vieron un efecto de contracción lenta y prolongada del músculo liso por acción de MTx1, de distinto tipo a la de carácter rápido, producida por la administración de acetilcolina exógena. El efecto de MTx1 fue antagonizado por atropina. En consecuencia, estos autores propusieron que, si bien MTx1 produce un efecto de contracción del músculo liso en este órgano, al igual que lo hace la acetilcolina, este efecto podría deberse a una acción antagonista sobre receptores presinápticos inhibitorios.

En cuanto al tejido cardíaco, es bien conocido que la acetilcolina se une a los receptores muscarínicos en las membranas de las células de músculo de aurícula y dispara una secuencia de eventos que conducen a la reducción de la frecuencia cardíaca. Los receptores muscarínicos cardíacos se sabe que son en su gran mayoría del subtipo M_2 (Waelbroeck y col., 1987a). Uno de los mecanismos por el cual la acetilcolina reduce la frecuencia cardíaca es la reducción de la corriente de K^+ activada por hiperpolarización (I_f, llamada "marcapasos"), la que fue encontrada en células del nodo sinoauricular (Difrancesco y col., 1986; van Ginneken y Giles, 1991). Otro mecanismo para el enlentecimiento de la frecuencia cardíaca es mediante la activación de una corriente de K^+ muscarínica (I_{KACh}), la que causa hiperpolarización de la

membrana de la célula auricular por incremento de la conductancia al K^+ (Sakmann y col., 1983; Breitwieser y Szabo, 1985; Pfaffinger y col., 1985; Carmeliet y Mubagwa, 1986; Kurachi y col., 1986; Kim, 1993).

Si bien hasta hace poco tiempo se pensaba que en tejido cardíaco sólo se encontraba presente el subtipo M_2 (ver Nathanson, 1987; Hulme y col., 1990; Caulfield, 1993), recientemente se observó la expresión del ARNm y proteína correspondientes al receptor m1 (Sharma y col., 1997). A pesar de que estos autores describen un efecto de los receptores m1 en miocitos ventriculares aislados sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular, un hipotético rol fisiológico, en caso de existir, no es todavía conocido (Sharma y col., 1997). La ausencia de efecto de estas toxinas sobre aurícula de cobayo sería una evidencia en contra de la participación del subtipo m1 en la respuesta de contracción.

La ausencia de efecto de MTx1, que observamos en tejido cardíaco, nos hace concluir, por lo tanto, que no existe acción alguna de MTx1 sobre los receptores del subtipo M_2, predominantes en esta preparación.

En contraste con los resultados negativos que obtuvimos en aurícula e íleo, ambas MTxs se comportaron en forma similar a los agonistas relativamente selectivos para el subtipo farmacológico M_1, McN-A 343 y CPCP (Nilson y col., 1992a,b), reduciendo las respuestas a estimulación de campo en las preparaciones de conducto deferente de conejo.

Eltze (1988) y Eltze y col. (1988) propusieron que el efecto de McN-A 343 está mediado por receptores M_1, aunque el receptor presináptico que media la inhibición de las contracciones evocadas por estimulación de campo en el conducto deferente de conejo, presenta un perfil atípico (Eltze, 1988). El neurotransmisor excitatorio principal es probablemente ATP, que actuaría sobre purinoceptores.

La pirenzepina actúa con alta afinidad en este sistema (pK_B = 7.6), lo que sugirió que el subtipo M_1 de receptor muscarínico debía estar involucrado (Eltze, 1988). Pero esta conclusión fue cuestionada debido a que la preparación tiene una sensibilidad relativamente alta por el ligando himbacina, relativamente selectivo para M_4 (Caulfield, 1993). Posteriormente se postuló que el receptor presináptico involucrado en la modulación de la liberación de noradrenalina en el conducto deferente de conejo sería del subtipo M_4 (Caulfield, 1993; Grimm y col., 1994a,b). Lambrecht y col. (1989a,b) reportaron valores de K_Ds aparentes para *p*-F-HHSiD, en conducto deferente de conejo, aproximadamente 3 veces más bajos que en el ganglio cervical superior, donde la depolarización está mediada por el subtipo M_1 (Brown y col., 1980). El panorama resulta complicado, debido a que existe inmunorreactividad positiva con un anticuerpo específico anti-m1, pero no con un anti-m4, en el conducto deferente de conejo (Dörje y col., 1991a). Además, el valor de pK_B aparente reportado para methoctramina —ligando M_2-M_4— (alrededor de 7; Lambrecht y col., 1989b) es algo más bajo que para un receptor M_4.

Los efectos de ambas toxinas podrían deberse a que actúan sobre ambos tipos de receptor. Los efectos de MTx1 (Figuras IV-7 y IV-8) sobre el conducto deferente de conejo no fueron bloqueados por el pretratamiento con pirenzepina, atropina o escopolamina, sino que más bien parecieron ser algo incrementados, aunque no significativamente. Adicionalmente, la ocupación irreversible del sitio agonista por la mostaza de 4-DAMP o de PBCM (Curtis y col., 1989) no impidió completamente los efectos de MTx1. Probablemente MTx1 se uniría a un sitio distinto del clásico de unión de agonistas. El hecho que moduladores alostéricos conocidos, como gallamina y tacrina, afecten las respuestas a MTx1, provee evidencia adicional para suponer que MTx1 podría unirse a un sitio alostérico.

Los efectos de MTx1 y MTx2 (Figuras IV-7 y IV-8) en preparaciones de conducto deferente de conejo son consistentes con la posibilidad de que activen receptores muscarínicos M_1 presinápticos inhibitorios; esto produciría inhibición de la liberación de los neurotransmisores excitatorios (noradrenalina y ATP), con la consecuente disminución en las contracciones. Aunque MTx1, inesperadamente, también produjo reducción en las respuestas a la noradrenalina (Figura IV-9A). Este neurotransmisor excitatorio actúa, entre otros, sobre los receptores adrenérgicos α_1 postsinápticos. Esta acción se confirmó en preparaciones de conducto deferente de rata (que carecería de receptores muscarínicos M_1 presinápticos), pero no explica los efectos inhibitorios sobre la altura de las contracciones fásicas evocadas en el conducto deferente de conejo: el bloqueo de las respuestas a noradrenalina se revirtió por lavado, mientras que los efectos sobre las contracciones fásicas no (Figura IV-9B); MTx1 redujo la altura de las respuestas fásicas aún en presencia de antagonistas α-adrenérgicos. Como se muestra en el capítulo II de resultados, los estudios de fijación específica con ^{3}H-prazosin, antagonista α-adrenérgico, confirmaron que MTx1 y MTx2 actuarían como ligandos competitivos reversibles de los receptores α_1-adrenérgicos, en membranas de corteza cerebral y en conducto deferente de rata. Entonces, los efectos de las MTxs se explicarían por su unión irreversible, o muy lentamente reversible, al receptor M_1 presináptico.

Hace tiempo que se sabe que el sistema colinérgico central está implicado en procesos de memoria (Bartus y col., 1982). Se utilizaron modelos, tanto animales como humanos, para una variedad de estudios con manipulaciones colinérgicas, para caracterizar el rol de la acetilcolina en la memoria (Kopelman, 1986; Hagan y Morris, 1988; Bymaster y col., 1993). Los agonistas colinérgicos muscarínicos facilitan el

aprendizaje y la memoria, mientras los antagonistas los inhiben o dificultan (ver Karczmar, 1995; Iversen, 1997).

La administración sistémica, intra-hipocampo, intra-septum o intra-amígdala del antagonista muscarínico escopolamina, inmediatamente luego del entrenamiento, produce amnesia en diversos paradigmas de aprendizaje en la rata (Izquierdo, 1989; Izquierdo y col., 1992a,b). Por lo tanto, la neurotransmisión colinérgica, por medio de los receptores muscarínicos, es importante para la plasticidad sináptica (Markram y Segal, 1990, 1992; Segal y Auerbach, 1997) y los procesos de memoria, especialmente en el período de consolidación. Este fenómeno, llamado consolidación, se supone que tiene lugar desde inmediatamente luego de la adquisición de un aprendizaje hasta entre 3 y 10 horas o más, con una duración más o menos variable, y en el cual la memoria se transforma de un estado inestable a otro más estable, de duración prolongada (ver Medina e Izquierdo, 1995; Desimone, 1992; Vnek y Rothblat, 1996).

Como dijimos, la estimulación de los receptores muscarínicos del hipocampo dorsal, inmediatamente después del entrenamiento en una tarea de evitamiento inhibitorio, produce un mejoramiento en la retención de la tarea durante la sesión de prueba de la evocación. Esto se considera como un mejoramiento en la consolidación de esa memoria (Izquierdo y col., 1992a). En forma congruente con estos resultados, la inhibición de los receptores muscarínicos en los mismos tiempos, produce una amnesia retrógrada total (Izquierdo y col., 1992a). Los resultados obtenidos con oxotremorina y escopolamina (Figuras IV-12 y IV-13) coinciden con hallazgos previos, y refuerzan la hipótesis de que los receptores muscarínicos funcionales son necesarios para la consolidación de esta memoria.

En los capítulos anteriores vimos que las toxinas MTx1 y MTx2 desplazan la fijación específica de radioligandos muscarínicos preferencialmente de los subtipos M_1

y M_4 de receptor. En este capítulo vimos que la toxina MTx2, y preliminarmente MTx1, mejoraron significativamente el desempeño en la sesión de prueba de los animales entrenados en esta tarea. Cualquiera sea el mecanismo, fue sensible a la inhibición por escopolamina, y tuvo una respuesta a las MTxs similar a la producida por oxotremorina. La interpretación más directa de estos hechos sugiere que las toxinas actuarían como agonistas. Entonces, el efecto facilitatorio sobre la consolidación de esta memoria, por parte de las toxinas, podría ser mediado por un efecto agonista sobre el receptor muscarínico M_1, aunque no puede descartarse la intervención del M_4. Esto concuerda con la interpretación de los resultados vistos en conducto deferente de conejo (más arriba, en este capítulo).

Hace algunos años se propuso una hipótesis que relaciona la formación de memorias con el establecimiento de un mecanismo plástico de modificación sináptica, denominado potenciación de larga duración (abreviatura en inglés: LTP), en ciertas zonas del sistema límbico, especialmente en hipocampo (Bliss y Collingridge, 1993). Luego se vió que este mecanismo plástico existía también en corteza cerebral. Algunos de los mecanismos propuestos para el LTP plantean la interacción entre las neurotransmisiones glutamatérgica y colinérgica. Experimentalmente se determinó que el agonista muscarínico carbacol, presumiblemente a través de receptores M_1, facilitó el establecimiento de LTP en la región CA3 del hipocampo (Maeda y col., 1993). Como mecanismo posible para explicar este efecto, se puede decir que la estimulación de los receptores M_1 puede producir un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} por activación de la hidrólisis del fosfatidilinositol (ver Nathanson, 1987; Hulme y col., 1990; Caulfield, 1993). Como el aumento del ion Ca^{2+} intracelular, ingresando por receptores NMDA y/o canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje, se ha planteado como necesario para la inducción de LTP, estos receptores metabotrópicos podrían intervenir en los cambios de excitabilidad neuronal requerido para la depolarización de la

membrana y activación consecuente del receptor NMDA, lo cual se debería a mecanismos que involucraran, por ejemplo, el IP_3. Además se ha hipotetizado que los receptores M_1 podrían incrementar la liberación de glutamato mediante la depolarización de membrana presináptica y/o también podrían bloquear la hiperpolarización postsináptica ("after-hyperpolarization"), luego de la depolarización, de neuronas hipocámpicas (Dutar y Nicoll, 1988; Johnston y col., 1992).

Capítulo V

Ensayos de fijación específica en cortes de cerebro de rata

Como vimos en los capítulos II y III de resultados, las toxinas MTx1 y MTx2 son capaces de inhibir la fijación específica de radioligandos muscarínicos a los receptores nativos presentes en varias estructuras del sistema nervioso central o periférico, así como a los receptores clonados expresados artificialmente en células en cultivo. La elaboración de experimentos de fijación específica de radioligandos muscarínicos en cortes de cerebro nos permite, por un lado, la verificación de congruencias con los experimentos realizados en homogenatos de membranas nativas o artificiales, y por otro, dada la selectividad de estas toxinas, la evaluación de la presencia y proporción de subtipos de receptor de varias estructuras cerebrales a la vez.

Ensayos de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS en cortes de cerebro de ratas

Se realizaron curvas de inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS por atropina y por las toxinas en paralelo, y se obtuvieron los correspondientes autorradiogramas. La Figura V-1 muestra un autorradiograma de un corte de cerebro de rata incubado con ^{3}H-NMS 0.5 nM; en el mismo se muestran las áreas elegidas para la cuantificación.

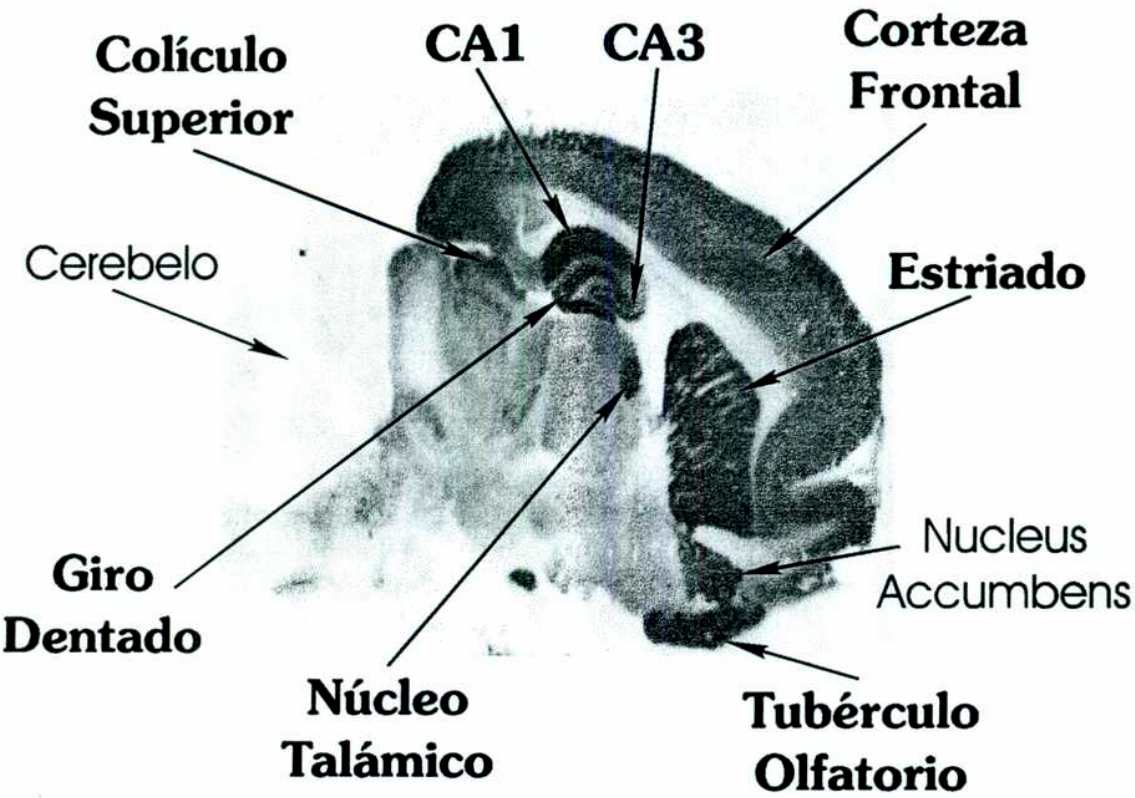


Figura V-1
Autorradiograma que muestra la fijación específica de ^{3}H-NMS 0.5 nM a un corte sagital de cerebro de rata (12 μm). Se señalan en negrita las áreas utilizadas para la cuantificación de los experimentos de inhibición por las MTxs.

Por supuesto, como puede verse en la Figura V-1, los valores absolutos (100%) correspondientes a cada estructura fueron diferentes, debido a la abundancia de sitios muscarínicos en cada una:

TABLA V-A

Número total de sitios muscarínicos (unión de ^{3}H-NMS) en las distintas estructuras cerebrales, medidos por cuantificación de los autorradiogramas de cortes de cerebro de rata, y de acuerdo a los estándares utilizados (fmol/µg de proteína):

Corteza frontal:	1.318 ± 0.386
CA1:	1.635 ± 0.265
CA3:	1.215 ± 0.281
Giro dentado:	1.590 ± 0.273
Cuerpo estriado:	2.000 ± 0.228
Colículo superior:	1.215 ± 0.179
Tubérculo olfatorio:	2.146 ± 0.322

En la Figura V-2 se muestran las imágenes de algunos de los autorradiogramas correspondientes a curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por MTx1 a cortes de cerebro. Podemos ver que, de la misma forma que en los experimentos en homogenatos de membranas nativas, la incubación con concentraciones crecientes de MTx1 produce un decremento en la fijación del antagonista ^{3}H-NMS. Esta inhibición por MTx1 no ocurre en forma homogénea en todo el cerebro, sino que depende de la estructura considerada. A simple vista se puede apreciar que la fijación de ^{3}H-NMS en el giro dentado se ve sensiblemente reducida por efecto de MTx1.

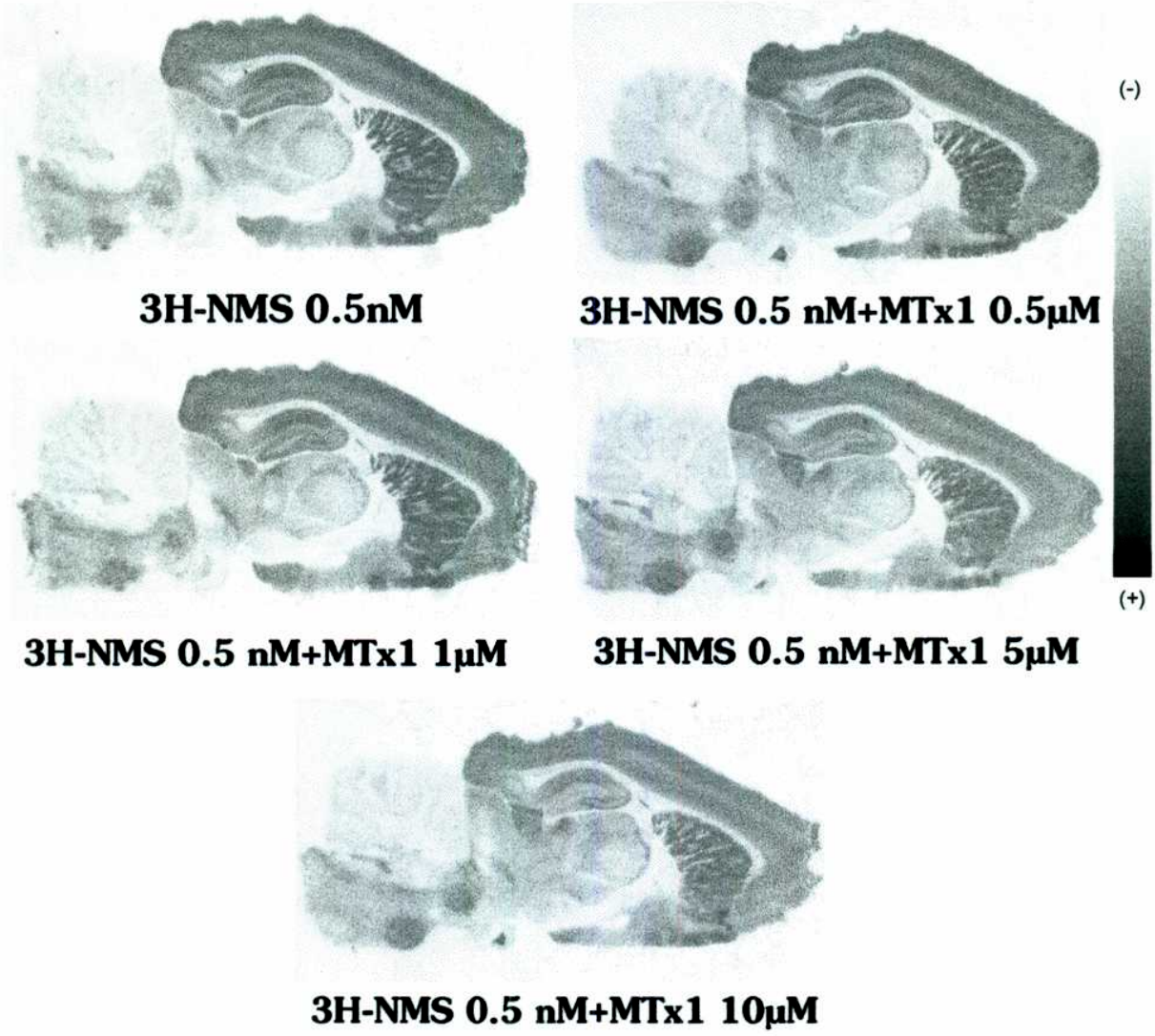


Figura V-2
Autorradiogramas que muestran la inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por la toxina MTx1 a cortes sagitales de cerebro de rata. A la derecha se muestra la escala de grises utilizada en la cuantificación; los grises más oscuros indican mayor cantidad de ^{3}H-NMS unida.

Asimismo, en la Figura V-3 se muestran las curvas de inhibición obtenidas de los autorradiogramas de la Figura V-2, luego de su cuantificación y ajuste a modelos de curvas de competición.

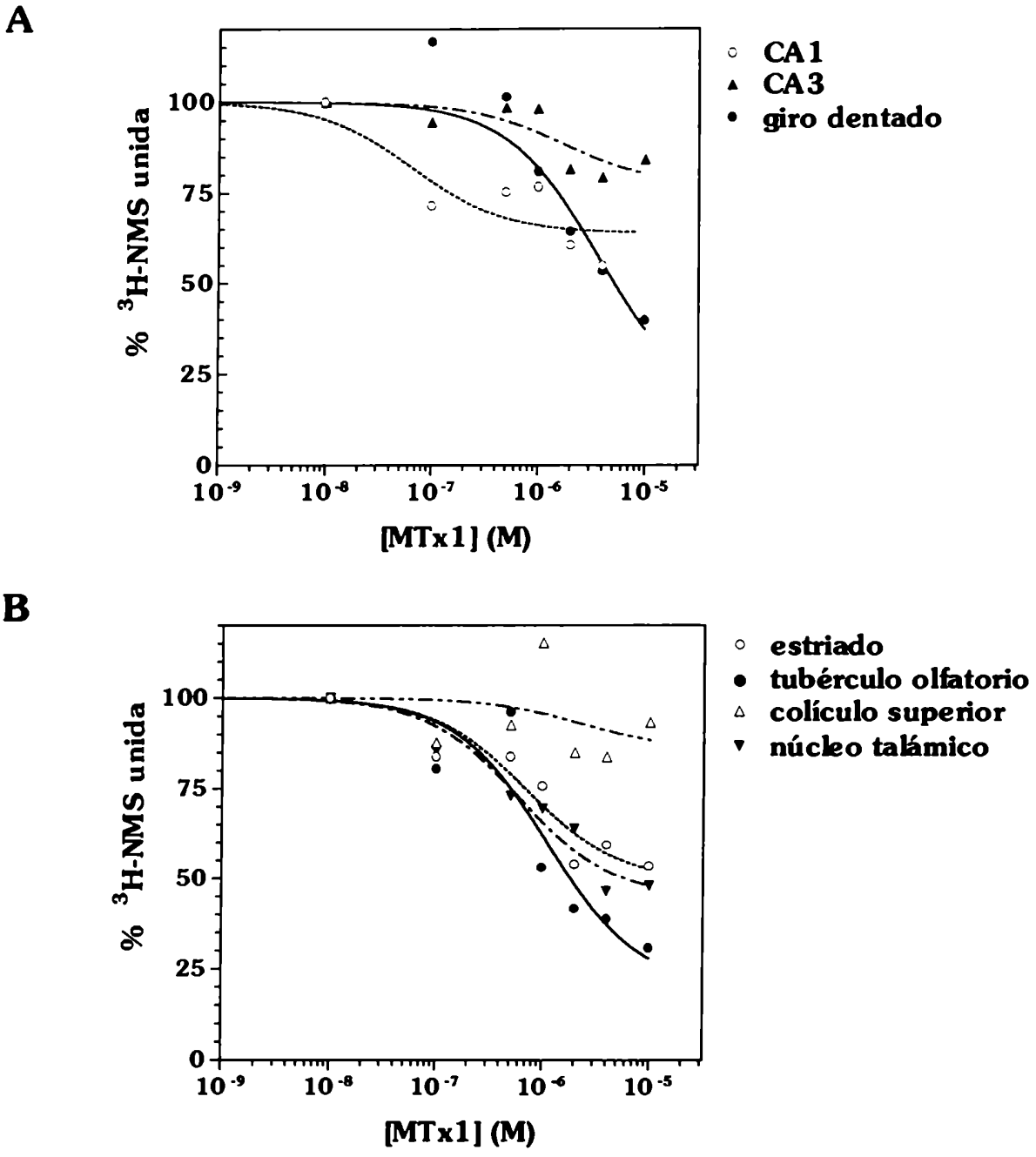


Figura V-3

Curvas de inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS por MTx1 en cortes de cerebro de rata.

A En las distintas zonas del hipocampo

B En las otras zonas del cerebro elegidas

De la misma forma que lo mostrado para MTx1, las Figuras V-4 y V-5 ilustran la inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS por MTx2 en cortes de cerebro de rata.

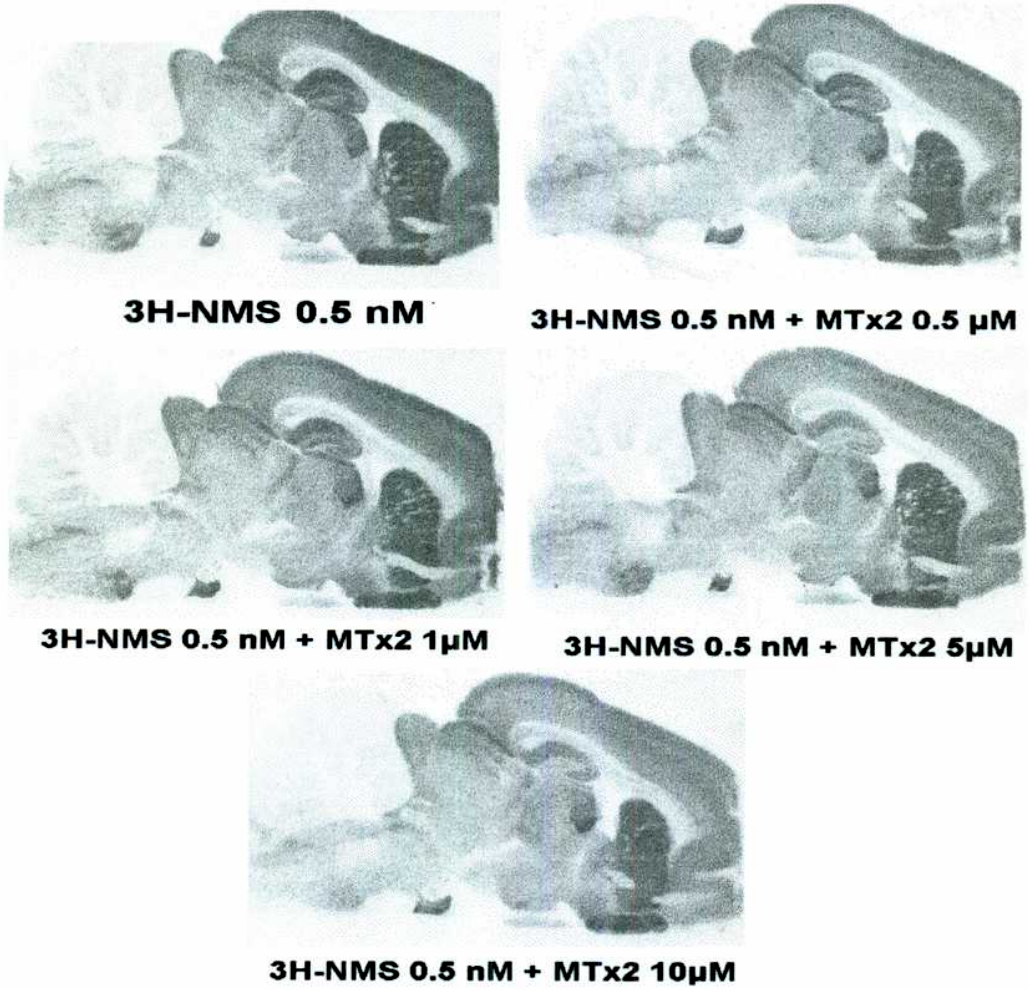


Figura V-4
Autorradiogramas que muestran la inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS por la toxina MTx2 a cortes sagitales de cerebro de rata. Se utilizó la misma escala de grises que en la Figura V-2. Los grises más oscuros indican mayor ^{3}H-NMS unida.

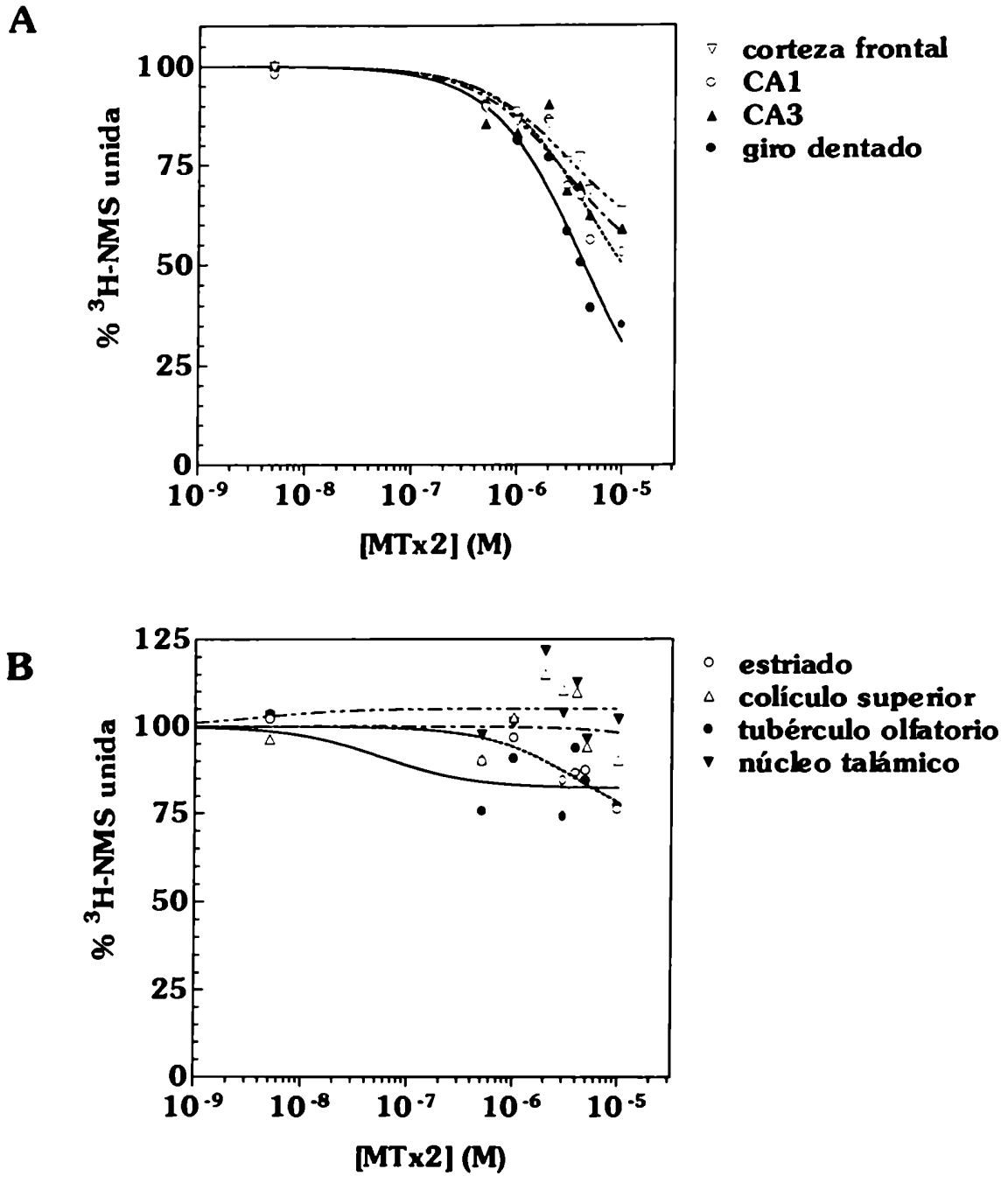


Figura V-5

Curvas de inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS por MTx2 en cortes de cerebro de rata.

A En las distintas zonas del hipocampo y corteza

B En las otras zonas del cerebro elegidas

En la Figura V-6 se muestran los gráficos de las curvas de inhibición por atropina, obtenidas de la cuantificación de los autorradiogramas en las diferentes estructuras, como corteza frontal, regiones del hipocampo, cuerpo estriado y otras. Todas esas curvas se superponen mostrando que el antagonista clásico no selectivo, atropina, reconoce a todos los sitios a los que se unió ^{3}H-NMS por igual. A la vez, estas curvas representan otra validación de los autorradiogramas obtenidos, así como del método utilizado para la cuantificación.

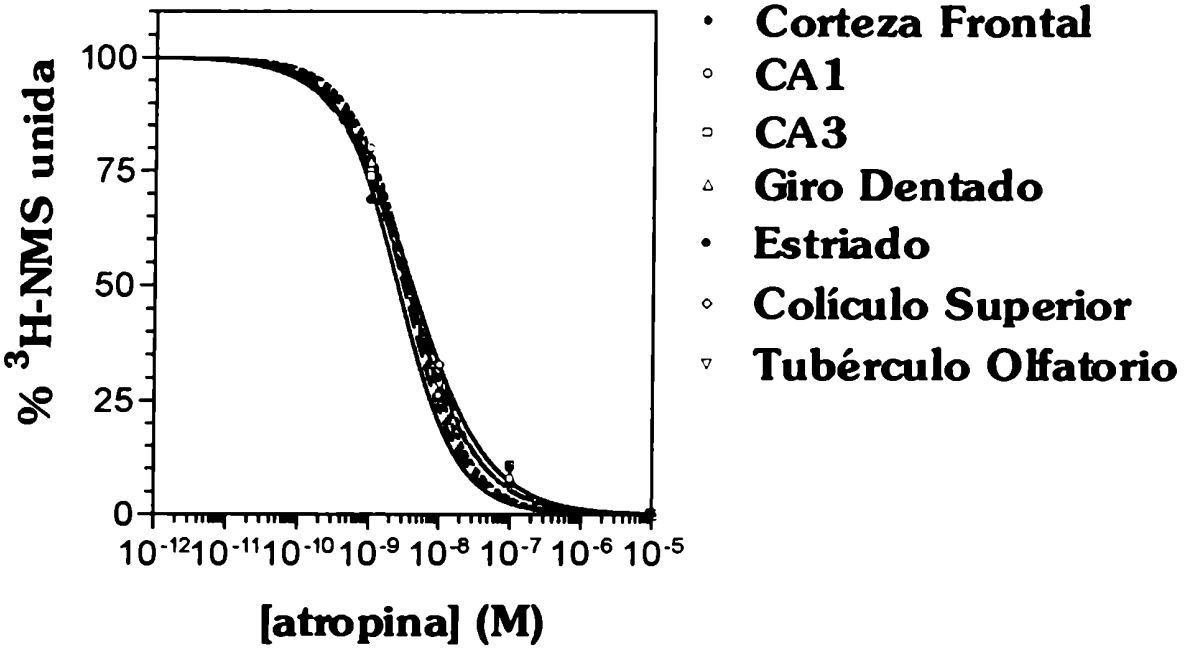


Figura V-6
Curvas de inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS por atropina en cortes de cerebro de rata. Como puede verse, este clásico antagonista no selectivo presenta un patrón de inhibición idéntico en todas las estructuras cuantificadas.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO V

Los experimentos de inhibición, por parte de las toxinas, de la unión de ^{3}H-NMS a cortes de cerebro de rata, muestran indirectamente la fijación de las toxinas a los receptores de cerebro.

Hasta el momento no existen claros estudios cuantitativos de los distintos subtipos moleculares de receptor, debido a la carencia de ligandos lo suficientemente selectivos. Además, debe tenerse en cuenta que los estudios de inmunohistoquímica no son, en general, cuantitativos, y menos aún en este caso, en el que los distintos anticuerpos anti-receptor se encuentran dirigidos hacia dominios intracelulares, lo que dificulta su utilización *in vivo* en células y cortes de cerebro, ya que poseen pobre penetración.

Las estructuras seleccionadas para la cuantificación de la fijación específica (Figura V-1) fueron elegidas debido a su fácil discriminación en las imágenes de los autorradiogramas, su alta densidad de receptores detectados, así como por su diversidad en cuanto a la composición de subtipos de receptor.

Un rasgo resaltable de este tipo de experimentos es la mayor dispersión de los datos para la cuantificación (mayor variabilidad), comparado con los experimentos realizados en suspensión de membranas nativas (capítulo II), por lo que consideraremos los resultados sólo en forma cualitativa.

En las Figuras V-3A y V-5A se muestran las curvas de inhibición con MTx1 y MTx2, respectivamente, trazadas para las diferentes regiones de la formación hipocámpica. Puede observarse, dentro de la formación del hipocampo, que la región que muestra mayor inhibición, o sea en la que hay mayor proporción de receptores con

alta afinidad por las MTxs, corresponde al giro dentado, cuya imagen prácticamente desaparece en los autorradiogramas con toxina. Las curvas parecen corresponder a una única clase de sitios. Es posible que en el giro dentado los receptores muscarínicos con alta afinidad por las toxinas, sean mayoritariamente del subtipo m1, dado que no hay prácticamente diferencia entre ambas toxinas (ver capítulo III). Tanto en CA1 como en CA3, las curvas reflejan una menor proporción de receptores sensibles a las MTxs, respecto del giro dentado.

En las Figuras V-3B y V-5B se muestran los resultados de la inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS por MTx1 y MTx2 en el cuerpo estriado, el colículo superior, el núcleo talámico y el tubérculo olfatorio. En ninguna de esas estructuras la inhibición fue evidente con MTx2. Aunque la inhibición por MTx1 sí fue evidente en el núcleo talámico, en el tubérculo olfatorio y en el estriado. Esta diferencia entre ambas toxinas indicaría la presencia de una gran proporción del subtipo m4 en estas estructuras, debido a la diferencia que existe entre ambas toxinas en cuanto a la afinidad por este subtipo de receptor. Recordemos que MTx1 presenta similar afinidad por los subtipos m1 y m4, mientras que MTx2 es más capaz de discriminar entre ellos, presentando mayor afinidad por el subtipo m1 (ver capítulo III).

Los resultados de la Figura V-6 muestran claramente las diferencias de la inhibición causada por un ligando no selectivo como atropina, respecto de la inhibición por las toxinas. Comparando las curvas de inhibición por atropina (Figura V-6) con los resultados de inhibición por las toxinas (Figuras V-3 y V-5), en las diferentes estructuras, puede verse que las curvas con el antagonista no selectivo atropina son semejantes para todas las estructuras estudiadas, mientras que con MTx1 y MTx2 son

diferentes. Estos resultados muestran que las MTxs se unirían diferencialmente a los receptores de cerebro de rata, con un notable poder discriminatorio, particularmente en el giro dentado, en el cual bajas concentraciones de toxinas inhiben casi completamente la marca específica de ^{3}H-NMS.

Resulta evidente, analizando los autorradiogramas, que las regiones en que hubo mayor inhibición son aquellas ricas en el subtipo farmacológico M_1, o en las que más abundan los mARN de los subtipos m1 y m4 (Hulme y col.,1990).

Durante tiempo ha sido estudiada la distribución de neuronas y sinapsis colinérgicas en el sistema nervioso central de mamíferos, identificándose proyecciones y sistemas interneuronales (Fibiger, 1982; Mesulam y col., 1983a,b). Desde hace algunos años se ha intentado cuantificar mediante autorradiografía la distribución de los subtipos farmacológicos de receptor muscarínico en cerebro de mamíferos mediante la utilización de antagonistas relativamente selectivos (Quirion y col., 1989; Frey y Howland, 1992; Albin y col., 1994; Raghavendra Rao y col., 1995; Narang, 1995; Aubert y col., 1996) o considerando también tasas de disociación diferenciales de algunos ligandos (Ferrari-Dileo y col., 1994; Waelbroeck y col., 1990). También se han utilizado anticuerpos para tratar de discriminar subtipos de receptor (Dörje y col., 1991a; Wall y col., 1991a,b; Li y col., 1991; Yasuda y col., 1993; Narang, 1995).

Frey y Howland (1992) mostraron, mediante estudios de autorradiografía cuantitativa de la inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS en cerebro de rata, por ligandos relativamente selectivos, como AF-DX 116, 4-DAMP o pirenzepina, que el subtipo farmacológico M_1 se encuentra predominantemente en el telencéfalo. Además sugirieron que el subtipo M_2 se encuentra ampliamente distribuido, aunque en escasas proporciones. El subtipo M_3 se encontraría en el tálamo, así como en la lámina

superficial del colículo superior (lo que es coherente con nuestros resultados) y en parte de la sustancia nigra. Resultados similares obtuvieron Aubert y col. (1996).

Teniendo en cuenta la bibliografía correspondiente, las resultados de inhibición que obtuvimos resultan coherentes con la localización propuesta para los distintos subtipos de receptor muscarínico.

Capítulo VI

Otras toxinas muscarínicas

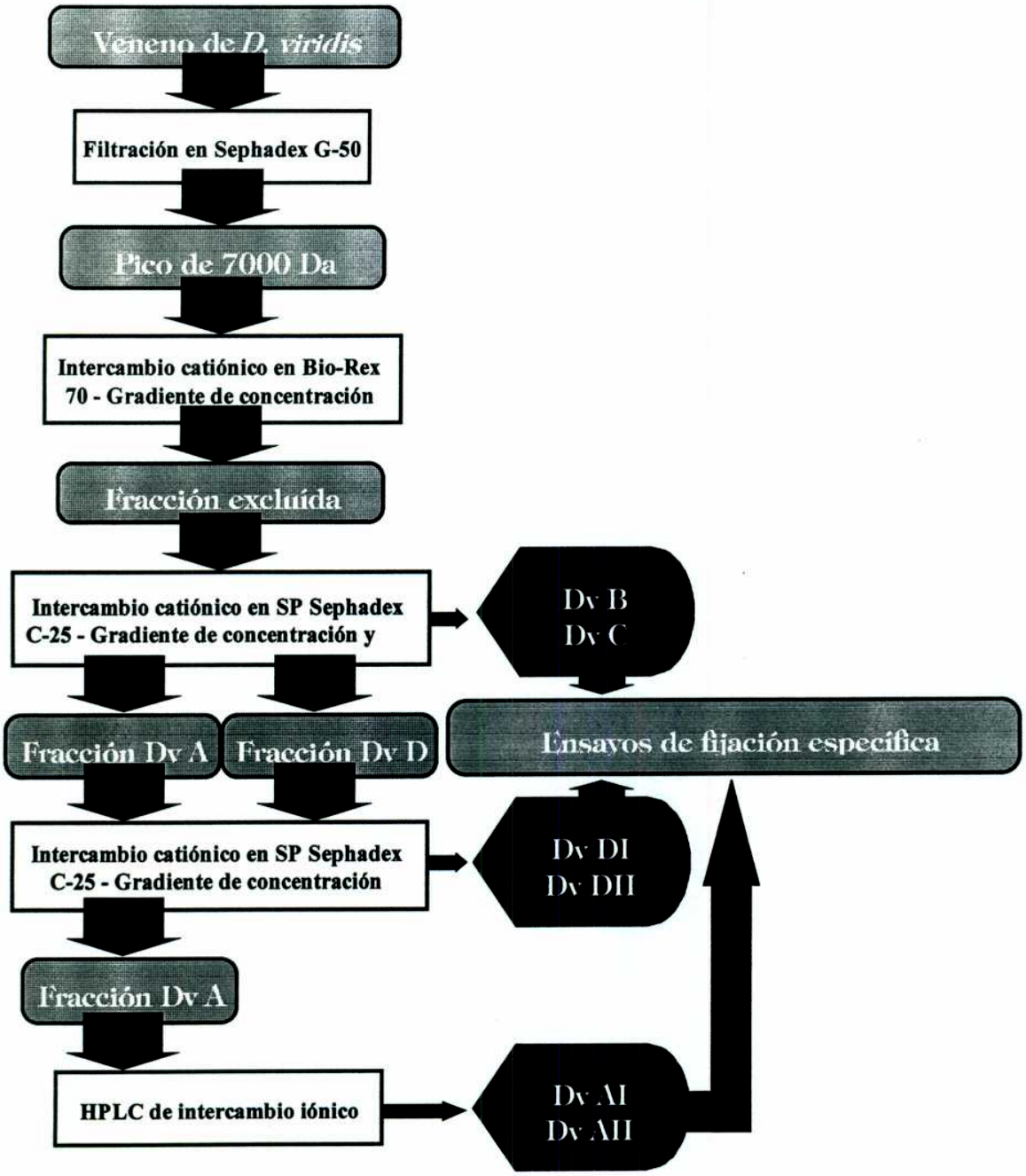
La presencia de péptidos con actividad sobre los receptores muscarínicos en el veneno de la mamba verde oriental (*Dendroaspis angusticeps*) es un hecho conocido a partir de fines de la década del '80 (Adem y col., 1988). Se han encontrado en dicho veneno, hasta el momento, más de ocho toxinas similares, con distinto grado de afinidad y selectividad (ver Jerusalinsky y col., 1997). Nosotros vimos actividad en el veneno y en fracciones del veneno de la mamba negra (*D. polylepis*) en 1992 (Jerusalinsky y col., 1992b, 1994). Algunos grupos de investigación hallaron péptidos homólogos en el veneno de la mamba negra (Karlsson y col., 1994; Jolkkoneny col., 1995b). En el presente capítulo nos dedicaremos a exponer los resultados que obtuvimos, hasta el momento, en la búsqueda emprendida sobre el veneno de la mamba verde occidental (*D. viridis*).

Los primeros experimentos que realizamos fueron con los venenos liofilizados de *D. viridis* y *D. polylepis*, probando la existencia de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-PZ en membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata (Jerusalinsky y col., 1994).

Una vez confirmada la presencia de actividad muscarínica en el veneno de *D. viridis*, decidimos purificar componentes que presentaran estas características. Para ello se usó un procedimiento similar al utilizado para la purificación de las toxinas MTx1 y MTx2 de *D. angusticeps* (ver sección Materiales y Métodos). Los pasos seguidos se encuentran detallados en el siguiente esquema:

ESQUEMA

Pasos utilizados para la purificación del veneno de *Dendroaspis viridis*



El veneno liofilizado fue sometido a un primer paso de Sephadex G-50, seleccionándose las fracciones de alrededor de 6000 a 9000 Da. El siguiente paso de cromatografía se hizo en el intercambiador catiónico Bio-Rex 70, cuya fracción excluída fue sometida a un primer paso de intercambio iónico en SP Sephadex C-25 (Figura VI-1).

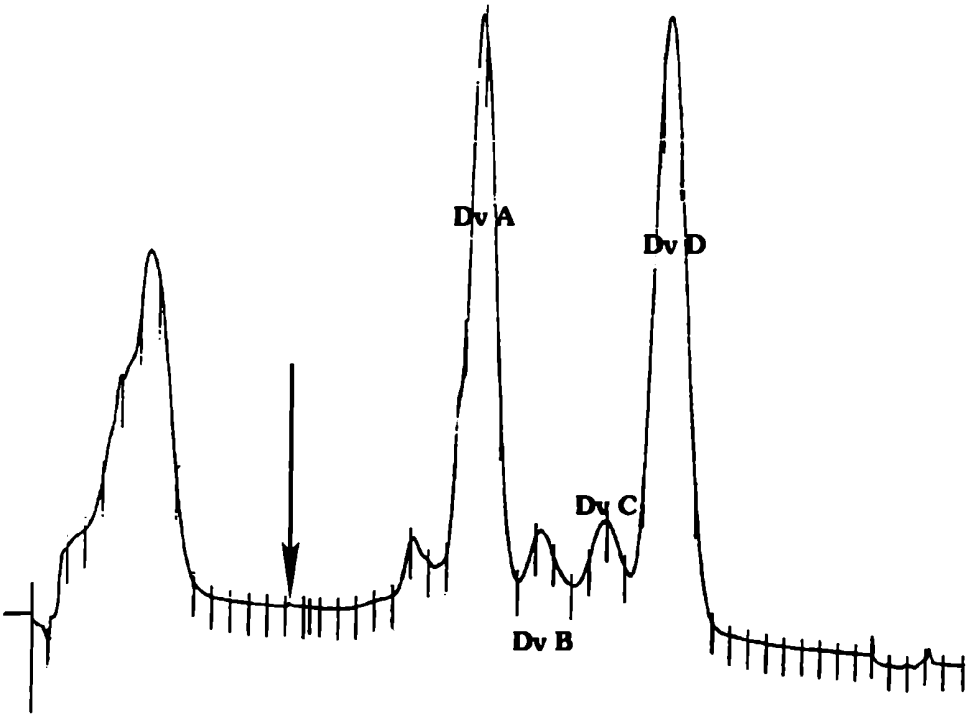


Figura VI-1
Primer paso de intercambio iónico en SP Sephadex C-25 de la muestra de Bio-Rex 70 (a partir de 1 g de veneno). El gel se equilibró en acetato de amonio (AmOAc) 0.05 M, pH 5.20 y la muestra liofilizada se disolvió para ser aplicada a la columna, la cual se eluyó con un gradiente lineal (que comenzó donde indica la flecha) realizado con un mezclador de gradientes Ultrograd, desde AmOAc 0.05 M, pH 5.20 hasta AmOAc 1 M, pH 6.50. Las fracciones estudiadas (que poseen actividad muscarínica) se indican con la denominación utilizada.

Como puede verse en la Figura VI-1, se obtuvieron cuatro picos (Dv A, B, C y D) en este paso cromatográfico, que poseyeron actividad muscarínica (es decir, inhiben la fijación específica de ^{3}H-NMS a membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata). La fracción Dv A fue sometida posteriormente a dos pasos sucesivos de purificación: una segunda cromatografía en SP-Sephadex C-25 (Esquema anterior, Figura VI-2), de la cual se tomó la fracción con actividad, también denominada Dv A, que se sometió a un paso de HPLC, resultando en dos picos, ambos con actividad muscarínica, Dv AI y Dv AII (Figura VI-3).

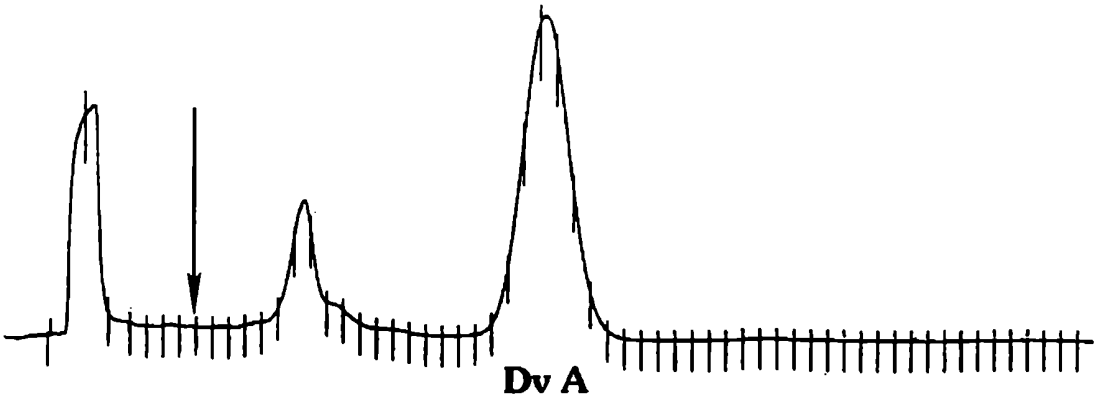


Figura VI-2
Segundo paso de intercambio iónico en SP Sephadex C-25 de la fracción Dv A del primer SP Sephadex. El gel se equilibró en AmOAc 0.01 M, pH 7.0 y la muestra liofilizada se disolvió para ser aplicada a la columna, la cual se eluyó con un gradiente linear (que comenzó donde indica la flecha) realizado con un mezclador de gradientes Ultrograd, desde AmOAc 0.01 M, pH 7.0 hasta AmOAc 0.5 M, pH 7.0. La fracción estudiada se indica con la denominación utilizada.

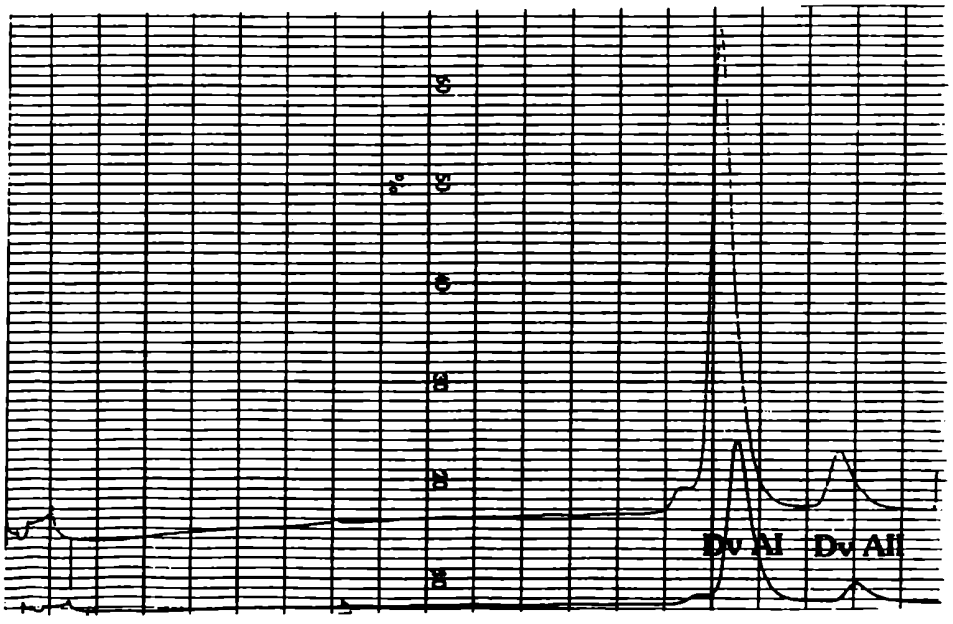


Figura VI-3
Cromatografía de HPLC de intercambio iónico de la fracción Dv A obtenida en el segundo paso de SP Sephadex. Se usó una columna TSK SP-5PW (8 × 75 mm). Luego de la aplicación de la muestra en agua, se realizó la elución con un gradiente linear hasta AmOAc 0.15 M, pH 6.8

La fracción Dv B del primer paso de SP-Sephadex (Esquema, Figura VI-1) fue sometida, para verificar su homogeneidad, a un paso de HPLC de intercambio iónico (Figura VI-4). Como resultado del mismo se pudo observar la presencia de un solo pico homogéneo —Dv B— el que se utilizó posteriormente para ser caracterizado en los experimentos de fijación específica de ^{3}H-NMS.

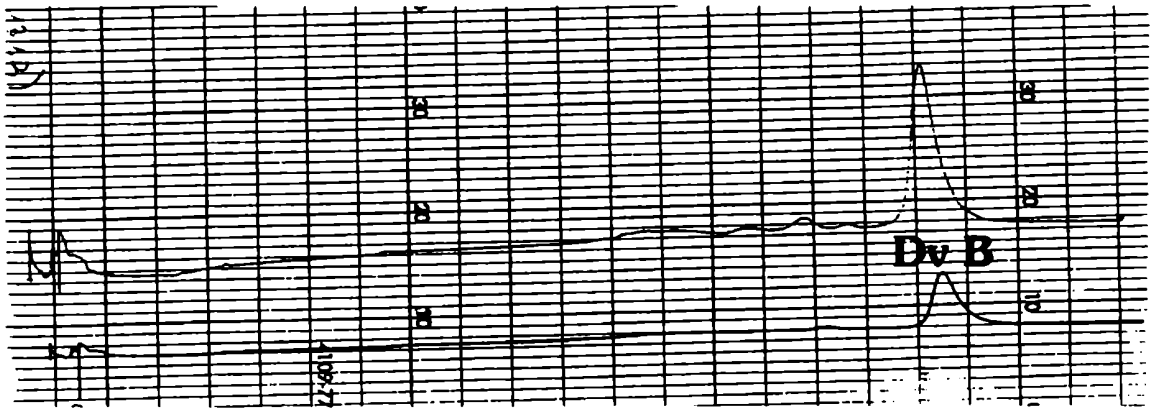


Figura VI-4
Cromatografía de HPLC de intercambio iónico de la fracción Dv B obtenida en el primer paso de SP Sephadex. Se usó una columna TSK SP-5PW (8 x 75 mm). Luego de la aplicación de la muestra en agua, se realizó la elución con un gradiente linear hasta AmOAc 0.15 M, pH 6.

Algo similar ocurrió para Dv C, el cual mostró ser un solo pico proteico en un paso posterior cromatográfico, al igual que Dv B (no mostrado).

La fracción Dv D del primer paso de SP-Sephadex (Esquema, Figura VI-1) fue sometida a un segundo SP-Sephadex, luego de lo cual se obtuvieron dos fracciones, Dv DI y Dv DII, con actividad muscarínica (Figura VI-5).

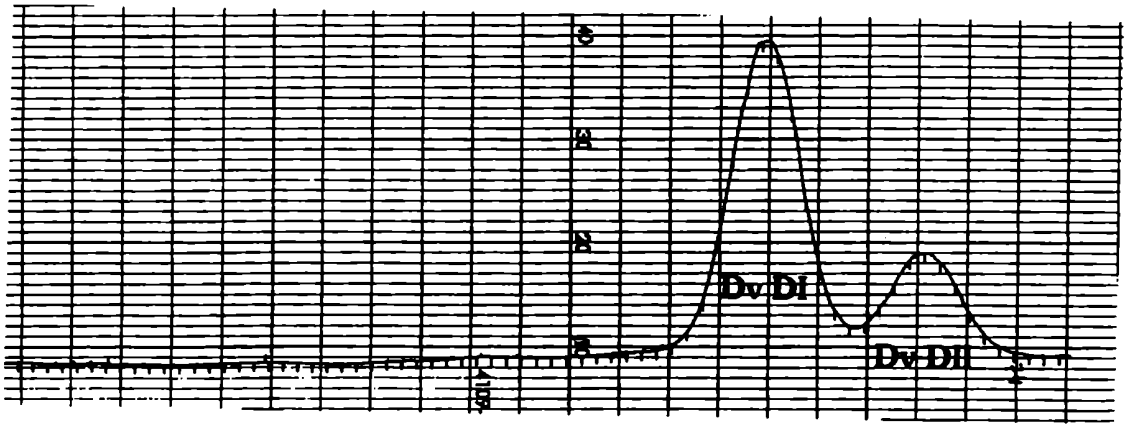


Figura VI-5
Segundo paso de intercambio iónico en SP Sephadex C-25 de la fracción Dv D del primer SP Sephadex. Se utilizaron las mismas condiciones que para la fracción Dv A. Las fracciones estudiadas se indican con la denominación utilizada.

Experimentos de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS

Las seis fracciones obtenidas (Dv AI-AII-B-C-DI-DII) fueron ensayadas en experimentos de fijación específica de ^{3}H-NMS a membranas sinaptosomales de corteza cerebral de rata. La Figura VI-6 muestra el efecto inhibitorio de las mismas con una concentración estimada de 10 µM cada una. Dv B y Dv C muestran la mayor potencia al inhibir la fijación de ^{3}H-NMS a los receptores muscarínicos de la corteza cerebral, seguidas por Dv AI y Dv AII.

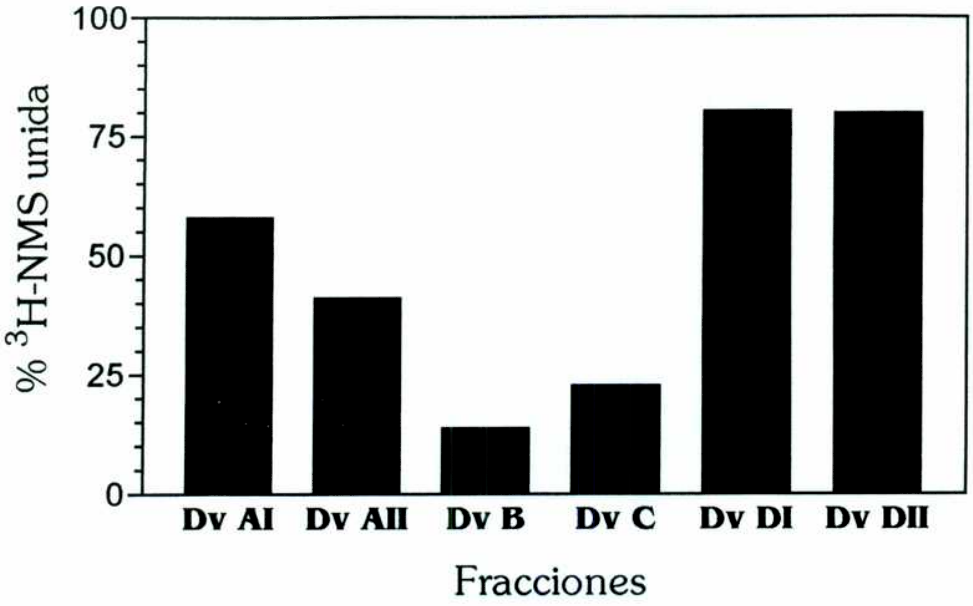


Figura VI-6
Diagrama de barras que representan el porcentaje unión específica de ^{3}H-NMS respecto del control, sin toxina, a membranas de corteza cerebral de rata, por varias fracciones obtenidas en los pasos de purificación del veneno de *D. viridis* (concentración estimada: 10 µM cada una, suponiendo pesos moleculares de 7000 Da).

Estas fracciones —Dv AI, Dv AII, Dv B y Dv C—, las que mostraron mayor inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS, fueron consideradas las más interesantes para comenzar a evaluar sus características de selectividad; se probaron en la inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS a subtipos puros de receptores humanos clonados (expresados en membranas de células Sf9 de insecto infectadas con baculovirus, de BioSignal Inc.). La Figura VI-7 muestra el efecto inhibitorio de estas cuatro fracciones con una concentración estimada de 10 µM cada una. Congruentemente con los resultados anteriores, Dv B y Dv C muestran la mayor potencia de inhibición, con el agregado de una selectividad aparente interesante: Dv B inhibió selectivamente la unión a los receptores m3 y m4, mientras Dv C parece selectiva por el subtipo m4.

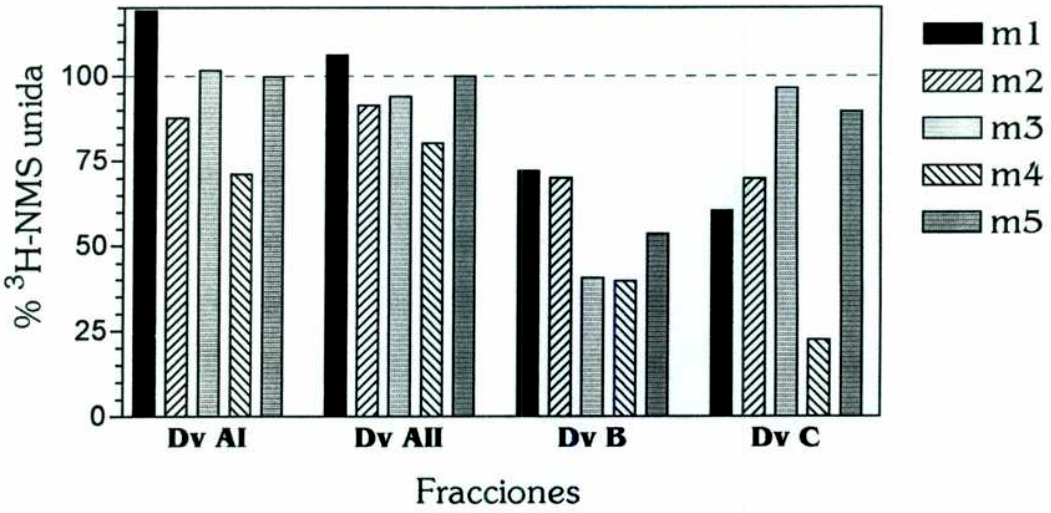


Figura VI-7
Diagrama de barras que representan el porcentaje de unión específica de ^{3}H-NMS respecto del control, sin toxina (100%), a subtipos puros de receptor muscarínico, por varias fracciones obtenidas en los pasos de purificación del veneno de *D. viridis* (concentración estimada: 10 μM cada una, suponiendo pesos moleculares de 7000 Da).

Considerando los resultados anteriores, era necesario realizar curvas de inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS de Dv B y Dv C en los subtipos por los cuales presentaban mayor afinidad.

La Figura VI-8 muestra curvas de inhibición por Dv B de la unión de ^{3}H-NMS a los subtipos m3 y m4 de receptor muscarínico. Como aparecía en la figura anterior, la toxina Dv B inhibe con alta afinidad la unión de ^{3}H-NMS a ambos subtipos, y en una forma similar.

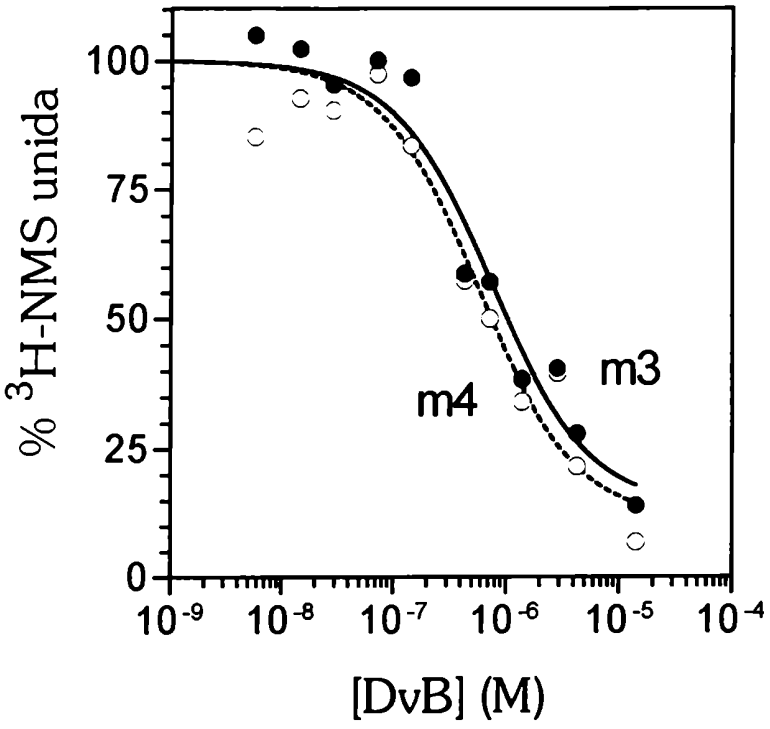


Figura VI-8
Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS a los subtipos m3 y m4 de receptor muscarínico humano clonado por la fracción Dv B. Las concentraciones de la fracción Dv B se estimaron suponiendo un peso molecular de 7000 Da. La concentración de ^{3}H-NMS usada fue 290 pM. Los valores de K_i obtenidos fueron 253 nM y 197 nM para m3 y m4, respectivamente.

Por otro lado, la toxina Dv C, como muestra la Figura VI-7, presentó una marcada afinidad y selectividad por el subtipo m4, respecto del m1, que era el siguiente en el grado de afinidad (Figura VI-9), con una diferencia de más de 50 veces en los respectivos valores de K_i.

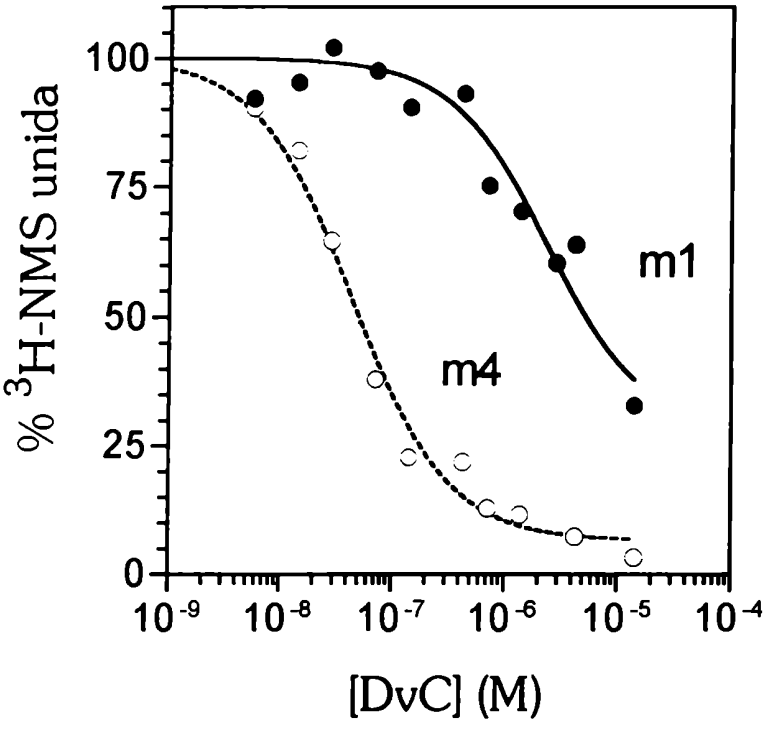


Figura VI-9

Curvas de inhibición de la fijación específica de ^{3}H-NMS a los subtipos m1 y m4 de receptor muscarínico humano clonados por la fracción Dv C. Las concentraciones de la fracción Dv C se estimaron suponiendo un peso molecular de 7000 Da. La concentración de ^{3}H-NMS usada fue 290 pM. Los valores de K_i obtenidos fueron 814 nM y 15 nM para m1 y m4, respectivamente.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO VI

Siguiendo un procedimiento similar al utilizado para la búsqueda de toxinas muscarínicas en el veneno de *Dendroaspis angusticeps*, hemos hallado fracciones homólogas en el veneno de *D. viridis*. Al menos cuatro de ellas —Dv AI, Dv AII, Dv B y Dv C— inhiben la fijación del antagonista muscarínico ^{3}H-NMS a receptores muscarínicos nativos (Figura VI-6) o clonados (Figura VI-7). Los resultados vistos con las fracciones Dv DI y Dv DII en membranas de corteza cerebral (Figura VI-6) parecieron poco prometedores, en principio, como para continuar con estas fracciones en los experimentos con receptores clonados.

Si bien los resultados de las Figuras VI-6 y VI-7 deben considerarse como preliminares, dado que son determinaciones de un único punto de fijación específica, son evidentes los efectos de las fracciones Dv AI y Dv AII, especialmente en membranas nativas (Figura VI-6). Dv AI inhibe aproximadamente un 45% la unión de ^{3}H-NMS a receptores nativos de corteza cerebral. Esto no se ve reflejado en los experimentos con receptores clonados, dado que sólo se aprecia un porcentaje menor de inhibición en los subtipos m2 y m4, que en corteza cerebral no se encuentran en una importante proporción. Es posible que el 45% de inhibición en corteza cerebral se corresponda con la cantidad de ambos subtipos sumadas. El incremento en la fijación de ^{3}H-NMS por Dv AI, observado en el subtipo m1 (Figura VI-7) queda por confirmarse en futuros experimentos.

La fracción Dv AII produjo una inhibición de aproximadamente un 60% en membranas de corteza cerebral (Figura VI-6). Esta misma fracción mostró un pobre efecto en los receptores clonados (Figura VI-7). En este caso la discordancia es mayor que con Dv AI. Ello podría deberse a que esta fracción fuera inestable en solución, que es como fue almacenada en el intervalo entre los dos experimentos. Sin embargo, en

ambos casos, tanto con Dv AI como con Dv AII, debe tenerse en cuenta que los experimentos con receptores nativos fueron realizados en corteza cerebral de rata, mientras que los receptores clonados fueron humanos. Entonces no puede descartarse que esta diferencia pueda deberse a esta razón, que las afinidades sean distintas en los receptores de las distintas especies.

Las fracciones que más llamaron nuestra atención en el primer experimento fueron Dv B y Dv C, las que mostraron mayor potencia inhibitoria en membranas de corteza cerebral (Figura VI-6). La fracción Dv B exhibió una gran potencia inhibitoria en corteza (más de 80% de inhibición, Figura VI-6), y parece inhibir selectivamente la unión de ^{3}H-NMS a los subtipos m3 y m4 de receptor muscarínico (Figuras VI-7 y VI-8).

La otra fracción estudiada en curvas de inhibición —Dv C— mostró también una gran potencia inhibitoria en corteza (más de un 75% de inhibición, Figura VI-6), y parece inhibir selectivamente la unión al subtipo m4; la K_i aparente fue más de 50 veces menor que la K_i sobre el receptor m1, que fue el siguiente en orden de afinidad (Figuras VI-7 y VI-9).

De acuerdo a sus características cromatográficas, estas fracciones podrían ser homólogas a las toxinas ya encontradas en los venenos de *D. angusticeps* y *D. polylepis* (ver Jerusalinsky y col., 1997), poseyendo pesos moleculares que rondan los 7000 Da.

Ya se conoce una toxina selectiva por el subtipo m4 de receptor que se encuentra en el veneno de *D. angusticeps* y ha sido denominada MT3 por el grupo de Karlsson (Jolkkonen y col., 1994; Olianas y col., 1996) y "m4-toxin" por el grupo de Potter (Max y col., 1993d).

Otra toxina ya conocida, y que presenta selectividad por los subtipos m3 y m4, es la llamada MTβ (Jolkkonen y col., 1995; Adem y Karlsson, 1997). Dicha toxina, del veneno de *D. polylepis*, presenta un perfil de selectividades casi idéntico a la fracción

Dv B, con las mayores afinidades por los subtipos m3 y m4, una afinidad intermedia por el subtipo m5, y menores por m1 y m2 (ver Figuras VI-7 y VI-8).

Por lo dicho anteriormente, Dv B podría ser homóloga de la toxina MTβ, mientras Dv C lo sería de la toxina MT3 o "m4-toxin".

Aún no se conocen las secuencias de estas toxinas halladas en el veneno de *D. viridis*. Esperamos secuenciarlas en un futuro próximo, lo que posibilitaría comprobar los grados de homología y comenzar estudios de relación entre estructura/secuencia-función, también con estas nuevas toxinas.

Discusión general

&

Conclusiones

Toxinas fabricadas por ciertos ofidios, vistas luego de este trabajo:

Los venenos de las serpientes llamadas mambas (*Dendroaspis*), de la familia Elapidae, contienen diversas neurotoxinas, las que son diferentes farmacológicamente de las encontradas en otras serpientes relacionadas. Además de las clásicas α-neurotoxinas (Chiappinelli, 1991; Adams y Swanson, 1996), que actúan sobre los receptores nicotínicos y son típicas de los venenos de elápidos, los venenos de las mambas contienen toxinas conspicuas, como las dendrotoxinas —bloqueantes de ciertos canales de K^+ voltaje-dependientes— (Harvey y Karlsson, 1980, 1982; Harvey y col., 1984; Harvey y Anderson, 1985; Berndt y col., 1993), las fasciculinas —inhibidoras potentes, no competitivas y específicas de algunas isoformas de la acetilcolinesterasa, particularmente de vertebrados superiores— (Rodríguez-Ithurralde y col., 1983; Karlsson y col., 1985; Dajas y col., 1988), calciseptinas —bloqueantes de canales de Ca^{2+} de tipo L— (De Weille y col., 1991), al igual que la calcicludina (Schweitz y col., 1994). Desde hace algunos años también se conocen otro tipo de toxinas presentes en venenos de mambas, que no poseen efectos conocidos sobre elementos específicos del sistema nervioso, como es la mambina, un potente inhibidor de la agregación plaquetaria (McDowell y col., 1992).

Paralelamente a nuestros trabajos, otros dos grupos han realizado estudios con toxinas muscarínicas de venenos de serpientes del género *Dendroaspis*: el grupo de Evert Karlsson, en Uppsala (Suecia), el que trabajó principalmente en la búsqueda de otros péptidos similares, secuenciando varios (MT1-7, de *D. angusticeps* y MTα y MTβ, de *D. polylepis*), y el grupo de Lincoln Potter, en Miami (EE.UU.), que trabajó básicamente con la "m1-toxin" y con la "m4-toxin" (posiblemente la mismas que MT7 y

MT3, respectivamente según Karlsson), secuenciándolas. Algunas de estas toxinas comenzaron a caracterizarse.

La estrategia general utilizada para el aislamiento de las toxinas muscarínicas consiste en sucesivos pasos cromatográficos: Sephadex G-50, Bio-Rex 70 y dos SP Sephadex. El primer paso de Sephadex G-50 se utilizó con el objetivo de aislar las MTxs del resto, lo cual es posible por esta técnica, ya que están alrededor del mismo peso molecular (7000-7500 Da). Los siguientes tuvieron el objetivo de separar las toxinas muscarínicas entre sí, los que se mejoraron aplicando gradientes más achatados —es decir, más lentos— que los utilizados al principio. Estas etapas permitieron la separación de las diferentes toxinas, las que fueron eventualmente recromatografiadas por RP-HPLC para evaluar su pureza. Esta estrategia general permitió a Karlsson y colaboradores aislar, como ya se mencionó, siete toxinas muscarínicas (MT1-MT7) del veneno de la mamba verde oriental (*D. angusticeps*) (Karlsson y col., 1994; Jolkkonen y col., 1993, 1994; Adem y Karlsson, 1997) y otras tres toxinas (MTα, MTβ y MTγ) del veneno de la mamba negra (*D. polylepis*) (Jolkkonen y col., 1995b). Nosotros hemos aislado dos toxinas de *D. angusticeps* que resultaron ser MT1 y MT2 de Karlsson, y hemos hallado de la una manera similar, con ligeras modificaciones, fracciones con actividad muscarínica (DvMT3 y DvMT3-4) en el veneno de la mamba verde occidental (*D. viridis*) (capítulo VI). El grupo de Potter, con técnicas cromatográficas ligeramente distintas, aisló varias toxinas muscarínicas del veneno de *D. angusticeps*, caracterizando la "m1-toxin", que es altamente homóloga a la MT7 del grupo de Karlsson (Max y col., 1993a,b,c) y la "m4-toxin", que es idéntica a la MT3 del grupo de Karlsson (Max y col., 1993d; Jolkkonen y col., 1994).

Previamente a los trabajos descriptos en la presente tesis, se reportó la existencia de las denominadas MTx1 y MTx2. Se sugirió que podían ser específicas para algún subtipo de receptor muscarínico, ya que inhibieron parcialmente la fijación específica de ^{3}H-QNB a membranas de cerebro de rata (Adem y col., 1988). Nuestra labor llevó a la confirmación de dicha suposición (Jerusalinsky y col., 1992a), y proseguimos con la caracterización farmacológica de estos péptidos, utilizando ensayos de fijación específica con radioligandos, tanto en tejidos nativos como en receptores clonados (capítulos II y III; Jerusalinsky y col., 1992a, 1994, 1995; Jerusalinsky y Harvey, 1994; Kornisiuk y col., 1995a,b,c). También tratamos de evaluar efectos farmacológicos asociados a las toxinas, en ensayos fisiológicos en órganos aislados y en el animal entero (Capítulo IV; Jerusalinsky y col., 1993, 1994, 1995; Kornisiuk y col., 1995a; Jerusalinsky y Harvey, 1994; Harvey y col., 1997).

Los ensayos realizados en receptores nativos mostraron que MTx1 y MTx2 presentan valores de K_is que varían desde las decenas a centenas de unidades (en concentraciones nanomolares), dependiendo de las estructuras, condiciones y radioligandos utilizados (capítulo II, Jerusalinsky y col., 1992; Jerusalinsky y col., 1995; Kornisiuk y col., 1995a). Con los experimentos en receptores humanos clonados se pudo demostrar que MTx1 y MTx2 presentan afinidad por el subtipo m1 de receptor, aunque también por el m4, siendo MTx2 más selectiva por m1 (mayor afinidad por los receptores m1) que MTx1 (capítulo III; Kornisiuk y col., 1995b,c). Ambas presentan mucho menor afinidad por el subtipo m5 y ninguna por m2 y m3.

La inhibición de la fijación de ^{3}H-NMS a los receptores por las toxinas MTx1 y MTx2, puede ajustarse, en general, a curvas de competición simples, es decir con un número de Hill igual a 1. En algunos casos esto no fue así —como en el caso de la inhibición del agonista ^{3}H-oxotremorina—, obteniéndose valores para el número de Hill alejados de la unidad. A pesar de todas estas consideraciones, Tuček y Proška (1995) han señalado que una inhibición competitiva es difícil de distinguir de un fuerte efecto alostérico negativo.

Ambas toxinas, MTx1 y MTx2, han sido marcadas con ^{125}I (capítulo II; Jerusalinsky y col., 1992a; Waelbroeck y col., 1996; Adem y Karlsson, 1997) y mostraron afinidades similares en su unión a membranas sinaptosomales de corteza cerebral de cerebro de rata (K_Ds cercanas a 20 nM). Un hecho para destacar, en cuanto a los experimentos con toxinas marcadas, es que la iodinación probablemente haría más selectiva a MTx1 por los receptores M_1. Aparentemente, las toxinas nativas se unen a los receptores M_1 y M_4, mientras que luego de la iodinación, MTx1 se uniría solamente al subtipo M_1 (Waelbroeck y col., 1996). Asimismo, la iodinación de MTx1 haría reversible su unión a los receptores muscarínicos (Waelbroeck y col., 1996).

Como se ha señalado en la discusión del capítulo II, el posible sitio de iodinación de las toxinas sería Tyr30, posición muy expuesta en la molécula y que formaría parte del sitio de unión de las toxinas al receptor muscarínico. La incorporación de un voluminoso átomo de iodo en ese lugar bien podría impedir la unión al subtipo m4 y conferirle un carácter reversible a la unión con el m1.

La mayoría de los demás experimentos de inhibición específica se realizaron con las toxinas no marcadas, en competencia con ligandos muscarínicos tritiados, tales como ^{3}H-NMS, ^{3}H-QNB, ^{3}H-PZ. Teniendo en cuenta la variabilidad de las afinidades observadas para MTx2, es necesario remarcar el cuidado en la asignación de estos

valores, dada la inestabilidad de esta toxina en ciertas condiciones (Karlsson y col., 1994; Ségalas y col., 1995b; Adem y Karlsson, 1997), probablemente debido a la hidrólisis de una unión particularmente lábil entre Asp53 y Pro54, que sería la causa de su rápida inactivación (Ségalas y col., 1995b).

Las toxinas muscarínicas aparentan ser, por todo lo señalado antes, los ligandos más selectivos, de los conocidos hasta el momento, por subtipos de receptor muscarínico.

Consideraciones acerca de la estructura de las toxinas:

Se ha postulado, dada la semejanza estructural que existe, que tanto las α-neurotoxinas como las toxinas muscarínicas bien podrían derivar de un gen ancestral común (Ducancel y col., 1991). Sin embargo, ambas clases de toxinas poseen especificidades diferenciales por los receptores nicotínicos (Karlsson, 1979; Chiappinelli, 1991; Adams y Swanson, 1996) y por los muscarínicos (Adem y col., 1988; Jerusalinsky y col., 1992a; Kornisiuk y col., 1995b,c). Entre los trece residuos conservados en todas las toxinas curaremiméticas, y propuestos como sitio de unión al receptor colinérgico nicotínico, solamente dos se encuentran también en MTx1 y MTx2 (Karlsson y col., 1991, 1994; Ducancel y col., 1991).

El patrón de puentes disulfuro y la estructura tridimensional han sido determinados para MTx2 (Ségalas y col., 1995a,b). Los residuos de cisteína se encuentran en las posiciones correspondientes a las encontradas en las α-neurotoxinas. Por consiguiente se puede predecir una estructura secundaria de las demás toxinas muscarínicas (ver Figura I-4), que correspondería a la de las conocidas como "three fingered toxins".

Además de los ocho residuos de cisteína conservados, las toxinas muscarínicas poseen Gly20, Gly41, Pro47 y Asn66, los que se encuentran conservados en todas las toxinas "three fingered". Probablemente estos residuos sean imprescindibles para un plegado normal de las moléculas.

En la Tabla I-B de este trabajo (página 74) se muestran las secuencias de 12 toxinas de venenos de mambas. Como está marcado, obviamente las nueve toxinas muscarínicas presentan mayor homología entre sí que con las otras tres toxinas, no muscarínicas. Poseen 30 aminoácidos en común, y en 17 posiciones presentan una sola diferencia entre las nueve. La homología entre las toxinas muscarínicas conocidas va desde un 60% hasta un 98%. Algunas de ellas son isotoxinas que difieren en sólo 1, 2 ó 3 aminoácidos. Como ejemplo, podemos mencionar a las toxinas MT4, de *D. angusticeps*, y MTα, de *D. polylepis*, las que solamente difieren en las posiciones 31-33 (Leu-Asn-His, para MTα y Ile-Val-Pro, para MT4). MTα presenta valores de K_i entre 3 y 44 nM para todos los subtipos de receptor muscarínico, mientras MT4 tiene valores de K_i de 62 nM para el receptor m1, 87 nM para el m4, y en el rango micromolar para el resto de los subtipos (Adem y Karlsson, 1997). Por lo tanto, la mutación LNP→IVP hace a la toxina incapaz de unirse a los subtipos m2, m3 y m5, y causa un decremento de 18 veces en la afinidad por el m4. Esto indica que la región 31-33 debe tener suma importancia en la interacción toxina-receptor.

Parece bastante probable, por lo mencionado anteriormente, que el "loop" 2, zona delimitada por Cys24 y Cys42, sea clave en la unión de las toxinas. En esta porción, las toxinas muscarínicas presentan 13 aminoácidos variables, de un total de 17; mientras que en las α-neurotoxinas sólo 8 sobre 16, son variables. De los aminoácidos conservados, solamente Tyr30 es exclusiva para las toxinas muscarínicas; los otros residuos invariables se encuentran altamente conservados en otras toxinas. La

posición 25 contiene un aminoácido hidrofóbico, en general Tyr en muscarínicas, y Phe, en algunas otras. También se encuentra altamente conservada una carga positiva en 27 (Lys, ó en pocos casos Arg), característica que se halla también en las α-neurotoxinas y en las cardiotoxinas. Gly41 parece también ser altamente conservada en todas.

Observando detenidamente las secuencias conocidas de las toxinas muscarínicas, se ve que la parte central de las mismas (aminoácidos 24-42) es rica en aminoácidos hidrofóbicos (6-9 aminoácidos hidrofóbicos), zona correspondiente al "loop" 2. Las zonas equivalentes en otras neurotoxinas poseen un número menor de aminoácidos hidrofóbicos: 2-5 en las α-neurotoxinas, 3-6 en las cardiotoxinas y 4 en las fasciculinas. En las toxinas muscarínicas, las mutaciones que habrían ocurrido preservan el carácter hidrofóbico de la región 27-40, una carga positiva (Lys o Arg) en las posiciones 27 y 34 y una carga negativa en la posición 37 (Asp o Glu). Esta característica les permitiría a las toxinas muscarínicas penetrar en la membrana, de modo que alguno de los grupos catiónicos —Lys/Arg 27 y 34— interactuase con un residuo Asp esencial del sitio de unión del receptor (Wess, 1993a,b).

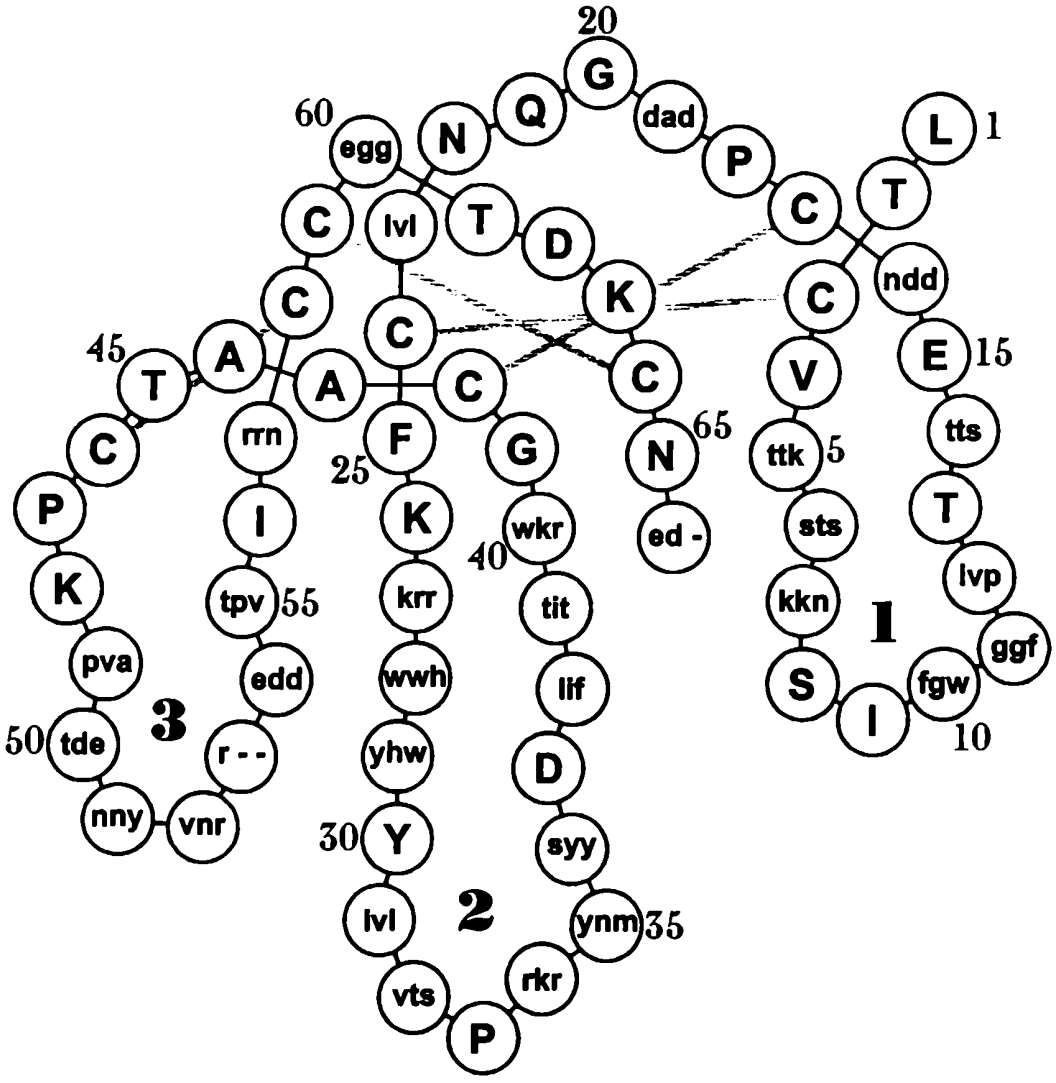


Figura D-1

Esquema que representa las estructuras de las toxinas MTx1, MTx2 (agonistas) y "m1-toxin" (antagonista). Las letras indican los aminoácidos correspondientes a las respectivas secuencias primarias.

Hay una alta homología entre las toxinas muscarínicas y las llamadas "toxinas sinergistas", de venenos de mambas. Como ya se señaló, MT3, toxina muscarínica del veneno *de D. polylepis*, difiere en sólo dos posiciones, de la toxina sinergística DpCM3. Las toxinas sinergistas han mostrado muy baja toxicidad intrínseca, pero incrementan la letalidad de otros componentes de los venenos de mambas. Los mecanismos de acción de estas toxinas son desconocidos hasta el momento; además, no se sabe cómo contribuyen las toxinas muscarínicas a la letalidad de los venenos. Es posible que alteren el control de la liberación de neurotransmisor a través de una acción sobre receptores muscarínicos presinápticos, o bien podrían contribuir a la alteración cardiovascular causada por el veneno, actuando sobre receptores muscarínicos en los vasos sanguíneos y miocardio. No obstante resulta difícil atribuir un rol funcional a las toxinas muscarínicas en los venenos de las mambas, dado que éstos contienen toxinas agonistas y antagonistas sobre los mismos subtipos de receptor muscarínico, aunque hasta el momento sólo se han encontrado concentraciones muy bajas de los antagonistas, y aún queda camino por recorrer en la caracterización de los perfiles farmacológicos, respecto a si se tratan de agonistas/antagonistas parciales, totales o con posibles efectos alostéricos.

Sobre el posible sitio de unión de las toxinas

Una serie de estudios bioquímicos, combinados con mutagénesis dirigida han sugerido que el sitio de unión de la acetilcolina al receptor muscarínico se encuentra en un "bolsillo" del receptor, delimitado por las siete hélices transmembranales (Curtis y col., 1989; Wess y col., 1993b; Spalding y col., 1994).

Se han reportado experimentos con receptores m2 y m3 quiméricos, intercambiando áreas correspondientes a las hélices transmembranales TMVI y TMVII

(ver Figura D-2), al tercer "loop" extracelular y a la cola citoplasmática, y expresándolos en células COS-7. Los resultados sugirieron que las características de afinidad de unión de antagonistas como HHSD, 4-DAMP, methoctramina e himbacina, involucran una serie de sitios diferentes, ampliamente separados en la estructura primaria o secuencia de aminoácidos del receptor (Wess y col., 1990). Además, en otra serie de experimentos, la sustitución de la secuencia TMI-TMV correspondiente al receptor m2, en el receptor m5, confirió la alta afinidad por los antagonistas AQ RA-741 e himbacina, generalmente más afines por el receptor m2. Sumado a esto, la inserción de las porciones TMVI y tercer "loop" extracelular correspondientes al receptor m5, en el m2, llevó consigo la alta afinidad por UH AH-37 y sila-hexocyclium, propia del receptor m5 (Wess y col., 1992).

Como puede verse, si bien se propone que existe una zona determinada para la unión de la acetilcolina, como es el bolsillo delimitado por los siete segmentos transmembranales, otros varios residuos del receptor aparentan estar involucrados en la interacción con compuestos que se unen al receptor, como los antagonistas mencionados.

En la Figura D-2 podemos ver un esquema del receptor con su "bolsillo", en el que se uniría la acetilcolina. Resulta llamativa la abundancia, en el segmento N-terminal, de aminoácidos exclusivos del subtipo m1, o bien compartidos sólo con el subtipo m4. Posiblemente esta porción del receptor interactúe de alguna manera con las toxinas. Además, si se compara a cualquiera de las MTxs con los ligandos muscarínicos clásicos, resulta evidente que aquellas son mucho más voluminosas y abultadas. Esto nos lleva a postular una interacción mayor y más compleja con las moléculas de receptor. En la Figura D-3 representamos hipotéticamente la unión de una molécula de toxina a una de receptor muscarínico.

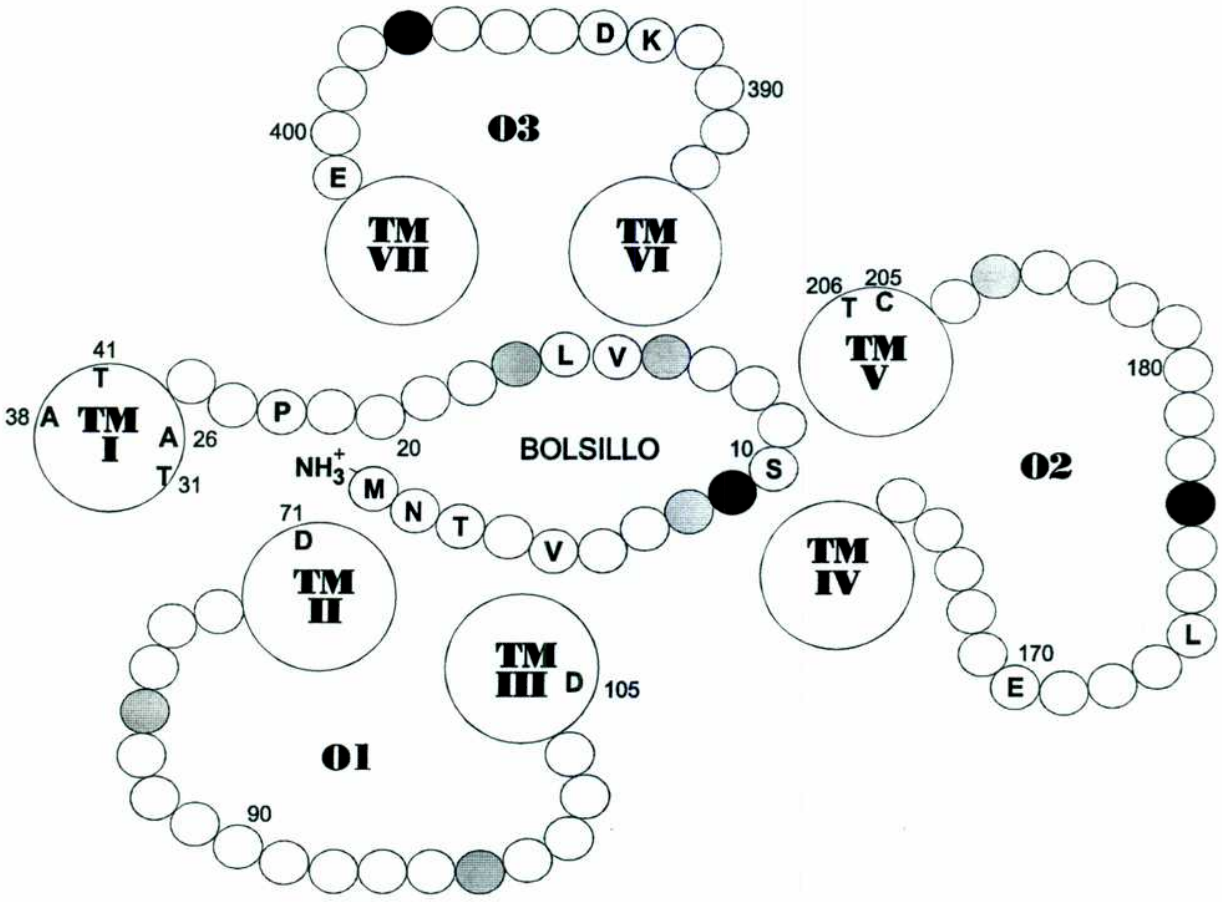


Figura D-2

Esquema del receptor muscarínico, visto desde el lado extracelular, que muestra el bolsillo de unión de la acetilcolina, formado por una cavidad delimitada por los siete segmentos transmembranales (TMI-VII). Los segmentos extracelulares están denominados como O1, O2 y O3. Los aminoácidos denotados con letras mayúsculas son exclusivos del subtipo m1, o bien no se encuentran conservados entre los subtipos m2-m5. Estos residuos podrían ser responsables de la unión de un ligando específico para el subtipo m1. Los residuos mostrados como negros o grises son los idénticos o conservados entre los subtipos m1 y m4, respectivamente.

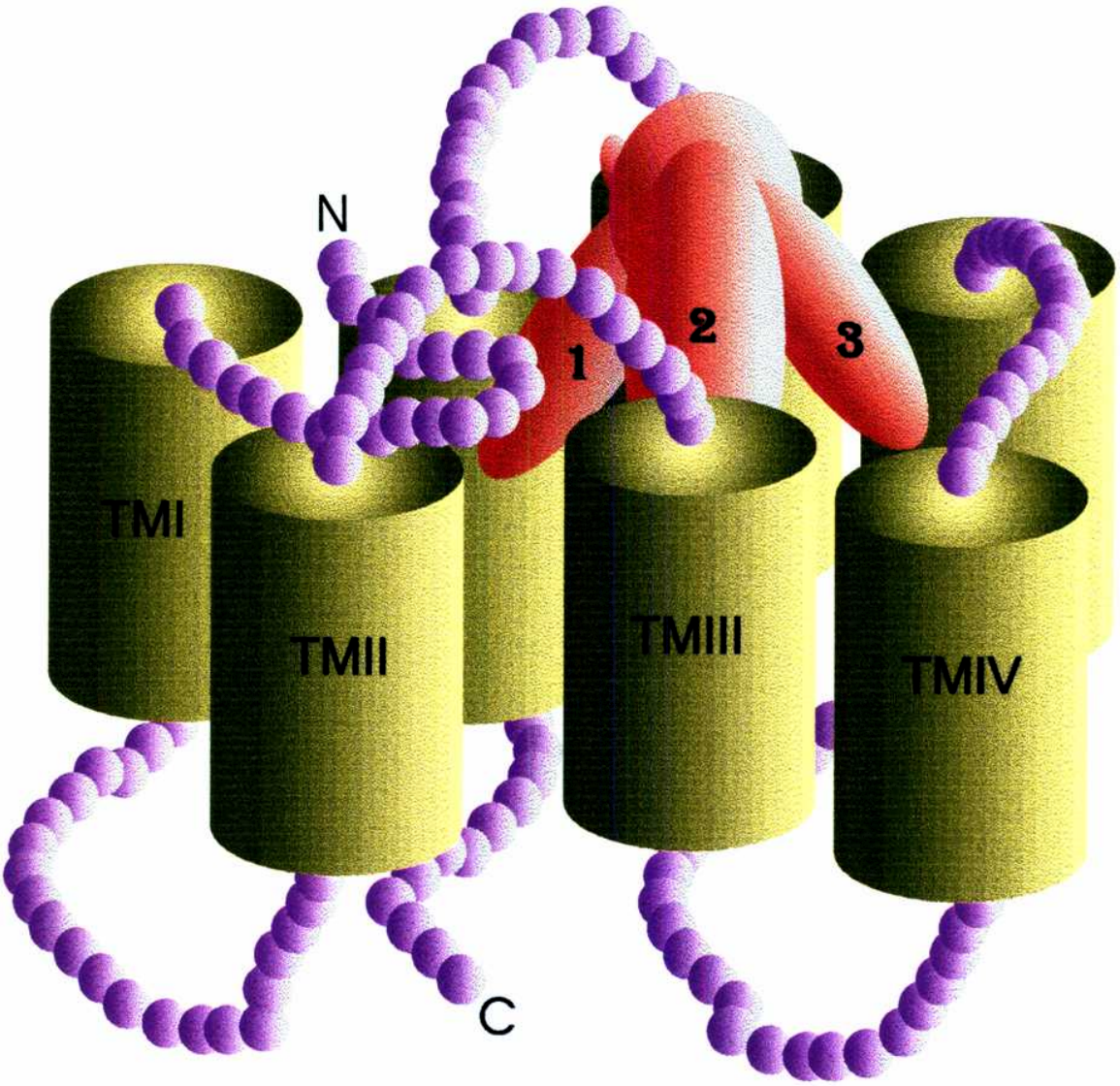


Figura D-3

Esquema que representa la posible ubicación de las toxinas muscarínicas en su unión a los receptores muscarínicos. Los segmentos transmembranales del receptor están representados como cilindros denominados TMI-TMVII, de color amarillento. Las esferas pequeñas azuladas representan los aminoácidos que forman los "loops" intra y extracelulares del receptor. El loop 2 de las toxinas (en rojizo) ocuparía, al menos parcialmente, el bolsillo de unión de agonistas del receptor.

Ubicándonos en el contexto histórico del estado de las investigaciones, resulta necesario comentar la confusa mezcla de nomenclaturas para estas toxinas. En primer lugar, esta denominación de "toxinas", dado que no hay evidencia de que posean efectos tóxicos. De hecho, estudios con fracciones homólogas mostraron poca toxicidad (ver para revisión Harvey y col., 1984). En segundo lugar, los dos grupos mencionados, que han aislado y caracterizado toxinas similares, eligieron dos nomenclaturas diferentes. Karlsson y colaboradores denominaron los péptidos como MT1, 2, 3, etc., de acuerdo al orden de elución en que aparecen en la cromatografía cuando son aisladas del veneno de *D. angusticeps*, y aparte denominaron MTα, β y γ a las aisladas del veneno de *D. polylepis*. Potter y su grupo, por su parte, eligieron denominar a las toxinas de acuerdo a su supuesto blanco primario, como "m1-toxin" y "m4-toxin". Siguiendo este último criterio, no está muy claro cómo denominar a toxinas con especificidad mixta, como las tratadas en este trabajo.

Una forma que proponemos para estandarizar la nomenclatura podría ser incluyendo símbolos, que identificaran tanto su origen como su blanco molecular primario. En forma de ejemplo, "m1-toxin" y "m4-toxin" del veneno de *D. angusticeps*, podrían ser denominadas, respectivamente, DaMT-1 y DaMT-4; asimismo las toxinas MTx1 y MTx2 (MT1 y MT2 para Karlsson y colaboradores) serían DaMT-1,4a y DaMT-1,4b. Las toxinas que hallamos en el veneno de *D. viridis* y caracterizamos parcialmente serían, siguiendo este criterio, DvMT-4 y DvMT-3,4.

Las toxinas muscarínicas han mostrado ser de gran utilidad para caracterizar y localizar subtipos de receptores muscarínicos, así como para estudiar algunas funciones en órgano aislado, en cultivo e incluso *in vivo*. Como algunas de las MTxs hasta ahora mejor caracterizadas parecen tener interacción con receptores α-adrenérgicos, hasta ahora el mejor modo de utilizar las MTxs para localización es usando ligandos clásicos como trazadores de los receptores muscarínicos. En estudios funcionales debe tenerse en cuenta esta posible interacción para evitarla en los casos necesarios.

Lesiones cerebrales o condiciones patológicas que afectan la integridad de los sistemas colinérgicos cerebrales, por un lado, y drogas que interactúan selectivamente con sinapsis colinérgicas, por el otro, producen una variedad de efectos, tanto en modelos animales experimentales como en cuadros clínicos. Sobre la base de una gran cantidad de observaciones, la inervación colinérgica de la neocorteza y de la formación hipocámpica, que se origina en las neuronas magnocelulares del cerebro basal anterior, en las ramas de la banda diagonal de Broca y en el septum medial (ver Introducción), (Whitehouse y col., 1981; Bartus y col., 1982; Coyle y col., 1983), ha sido involucrada en un rol fundamental en la cognición, con participación notable en el establecimiento de la memoria.

Las interneuronas colinérgicas y los receptores muscarínicos en el estriado se encuentran alterados en varios desórdenes clínicos de los ganglios basales, incluyendo la corea de Huntington (Enna y col., 1976; Wastek y Yamamura, 1978), la parálisis supranuclear progresiva (Ruberg y col., 1985; Agid y col., 1986) y la enfermedad de Parkinson (Ruberg y col., 1982; Ahlskog y col., 1991). Asimismo, se encuentran involucrados en la terapia anticolinérgica de la enfermedad de Parkinson (Fahn y

Calne, 1978) y la distonía (Fahn, 1983). Finalmente, las neuronas colinérgicas del tallo cerebral han sido implicadas en la regulación del sueño y la vigilia (Sitaram y col., 1977; Quattrochi y col., 1989). Por lo tanto, puede apreciarse el potencial terapéutico que puede tener la intervención farmacológica sobre la neurotransmisión colinérgica central.

Las intervenciones terapéuticas sobre las sinapsis colinérgicas muscarínicas están frecuentemente limitadas, ya que el uso de agentes muscarínicos o anticolinesterásicos desencadenan efectos colaterales a las dosis necesarias para una respuesta clínica. Por lo tanto, el desarrollo de agentes selectivos, dirigidos a sistemas neuroanatómicos y subtipos específicos de receptor, pueden mejorar los resultados de la terapia colinérgica. Los estudios descriptivos en cuanto a la composición de subtipos de receptor muscarínico en distintas estructuras del sistema nervioso central, así como el desarrollo de agentes selectivos para los mismos, pueden proveer un estudio racional para el mejoramiento de este tipo de terapias.

Asimismo, las MTxs podrían servir de modelo para el estudio de las relaciones entre estructura y función, o estructura, secuencia y selectividad, tanto para el desarrollo de drogas más selectivas como para el estudio de localización y funciones específicas de subtipos de receptor muscarínico *in vivo*.

- Las toxinas muscarínicas poseen 65-66 aminoácidos y cuatro puentes disulfuro. Son homólogas entre sí y con otras toxinas similares, no muscarínicas. Entre ellas, MTx1 y MTx2, del veneno de la mamba verde oriental (*Dendroaspis angusticeps*), son las primeras proteínas conocidas, aisladas de organismos animales, que se unen con alto grado de selectividad a receptores muscarínicos.
- MTx1 y MTx2 inhibieron la unión específica de radioligandos muscarínicos en membranas nativas de distintas áreas del sistema nervioso central de rata, mostrando una selectividad por el subtipo farmacológico M_1 de receptor.
- Ensayadas con receptores humanos clonados, las toxinas inhibieron selectivamente la unión del radioligando ^{3}H-NMS a los subtipos m1 y m4, siendo MTx2 más selectiva para m1, aunque menos potente.
- MTx1 y MTx2 inhibieron la unión específica del radioligando adrenérgico ^{3}H-prazosin a membranas nativas de corteza cerebral de rata y conducto deferente de rata y conejo.
- La unión de las toxinas a los receptores muscarínicos mostró ser irreversible, mientras que la unión a los receptores α-adrenérgicos aparenta ser reversible.
- MTx1 y MTx2 se comportaron como agonistas muscarínicos M_1 en conducto deferente de conejo y en un paradigma de evitación inhibitoria en la rata, contrastando con los postulados perfiles antagonistas de la "m1-toxin".
- La facilitación de la consolidación de la memoria por MTx2, bloqueable por escopolamina, en el hipocampo de rata, corrobora la participación del subtipo

de receptor m1 en los procesos de formación de memorias, siendo su contribución positiva.

- Debido a sus selectividades, MTx1 y MTx2, junto con otras varias toxinas muscarínicas, resultan herramientas útiles para estudiar la distribución en cerebro de subtipos discretos de receptor. En particular, la distribución de los sitios sensibles a las MTxs en cerebro de rata coinciden, en general, con los reportados para el subtipo M_1 mediante otras metodologías o agentes.

- DvMT4 y DvMT3-4, dos polipéptidos del veneno de la mamba verde occidental (*D. viridis*), mostraron ser selectivos por los subtipos m4 y m3-m4, respectivamente.

Bibliografía

1. Adams, M. y Swanson, G. (1996) Neurotoxin Supplement, 2da edición. Trends Neurosci. (Junio).

2. Adem, A., Asblom, A., Johansson, G., Mbugua, P. y Karlsson, E. (1988) Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. Biochem. biophys. Acta 968: 340-345.

3. Adem, A. y Karlsson, E. (1997) Muscarinic receptor subtype selective toxins. Life Sci. 60: 1069-1076.

4. Agid, Y., Javoy-Agid, F., Ruberg, M., Pillon, B., Dubois, B., Duyckaerts, C., Hauw, J., Baron, J. y Scatton, B. (1986) Progressive supranuclear palsy: Anatomo-clinical and biochemical considerations. Adv. Neurol. 18: 191-206.

5. Ahlskog, J., Richelson, E., Nelson, A., Kelly, P., Okazaki, H., Tyce, G., van Heerden, J., Stoddard, S. y Carmichael, S. (1991) Reduced D2 dopamine and muscarinic cholinergic receptor densities in caudate specimens from fluctuating Parkinsonian patients. Ann. Neurol. 30: 185-191.

6. Alberts, P., Bartfai, T. y Stjarne, L. (1982) Effects of atropine on [^{3}H]acetylcholine secretion from guinea-pig myenteric plexus evoked electrically or by high potassium. J. Physiol. (Lond.) 329: 93-112.

7. Albin, R., Howland, M., Higgins, D. y Frey, K. (1994) Autoradiographic quantification of muscarinic cholinergic synaptic markers in bat, shrew, and rat brain. Neurochem. Res. 19: 581-589.

8. Anderson, A. y Harvey, A. (1988) Effects of the potassium channel blocking dendrotoxins on acetylcholine release and motor nerve terminal activity. Br. J. Pharmacol. 93: 215-221.

9. Aubert, I., Cécyre, D., Gauthier, S. y Quirion, R. (1992) Characterization and autoradiographic distribution of [^{3}H]AF-DX 384 binding to putative muscarinic M_2 receptors in the rat brain. Eur. J. Pharmacol. 217: 173-184.

10. Aubert, I., Cécyre, D., Gauthier, S. y Quirion, R. (1996) Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. J. Comp. Neurol. 369: 31-35.

11. Bartus, R., Dean, R., Beer, B. y Lippa, A. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science 217: 408-417.

12. Belleau, B., Benfey, B. y Melchiorre, C. (1982) Presynaptic effect of clonidine antagonized by the tetramine disulphide, benextramine. Brit. J. Pharmacol. 75: 617-621.

13. Bennet, J. (1978) Methods in binding studies. En: "Neurotransmitter Receptor Binding". (Eds: H. Yamamura, S. Enna, M. Kuhar). Raven Press, New York, USA, pp 57-61.

14. Bennet, J. y Yamamura, H. (1985) Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. En: "Neurotransmitter Receptor Binding". 2da ed. (Ed: H. Yamamura, S. Enna, M. Kuhar). Raven Press, New York, USA, pp 61-90.

15. Berndt, K., Güntert, P. y Wüthrich, K. (1993) Nuclear magnetic resonance solution structure of Dendrotoxin K from the venom of *Dendroaspis polylepis polylepis*. J. Mol. Biol. 234: 735-750.

16. Bernheim, L., Mathie, A. y Hille, B. (1992) Characterization of muscarinic receptor subtypes inhibiting Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 9544-9548.

17. Berstein, G., Blank, J., Jhon, D., Exton, J., Rhee, S. y Ross, E. (1992a) Phospholipase C-ß1 is a GTPase-activating protein for $G_{q/11}$, its physiologic regulation. Cell 70: 411-418.

18. Berstein, G., Blank, J., Smrcka, A., Higashijima, T., Sternweis, P., Exton, J. y Ross, E. (1992b) Reconstitution of agonist-stimulated phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate hydrolysis using purified m1 muscarinic receptor, $G_{q/11}$, and phospholipase C-ß1. J. Biol. Chem. 267: 8081-8088.

19. Bigl,V., Woolf, N. y Butcher, L. (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.

20. Birdsall, N. (chairman) (1989) Nomenclature for muscarinic receptor subtypes. In: Subtypes of Muscarinic Receptors IV. Proc. Fourth Int. Symp. Subtypes of Muscarinic Receptors (Trends Pharmacol. Sci., December 1989, Suppl.) pp VII.

21. Birdsall, N., Buckley, N., Doods, K., Fukuda, A., Giachetti, A., Hammer, R., Kilbinger, H., Lambrecht, G., Mutschler, E., Nathanson, N., North, A. y Schwarz, R. (1989) Nomenclature for muscarinic receptor subtypes recommended by symposium. Trends Pharmacol. Sci. 4: VII.

22. Birdsall, N., Burgen, A. y Hulme, E. (1978) The binding of agonists to brain muscarinic receptors. Molec. Pharmacol. 14: 723-736.

23. Birdsall, N., Hulme, E., Stockton, J., Burgen, A., Berrie, C., Hammer, R., Wong, E. y Zigmond, M. (1983) Muscarinic receptor subclasses: evidence from binding studies. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 37: 323-329.

24. Blaustein, M. (1975) Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. J. Physiol. 247: 617-655.

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

26. Bolton, T. y Zholos, A. (1997) Activation of M_2 muscarinic receptors in guinea-pig ileum opens cationic channel modulated by M_3 muscarinic receptors. Life Sci. 60: 1121-1128.

27. Bonner, T. (1989) The molecular basis of muscarinic receptor diversity. Trends Neurosci. 12: 148-151.

28. Bonner, T., Buckley, N., Young, A. y Brann, M. (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. Science 237: 527-532.

29. Boulay, S., Sood, V., Rayeq, M., Cohen, V., Zeeberg, B. y Reba, R. (1996) Autoradiographic evidence that 3-quinuclidinyl-4-fluorobenzilate (FQNB) displays in vivo selectivity for the m2 subtype. Neuroimage 3: 35-39.

30. Breitwieser, G. y Szabo, G. (1985) Uncoupling of cardiac muscarinic and ß-adrenergic receptors from ion channels by a guanine nucleotide analogue. Nature 317: 538-540.

31. Brown, D., Abogadie, F., Allen, T., Buckley, N., Caulfield, M., Delmas, P., Haley, J., Lamas, J. y Selyanko, A. (1997) Muscarinic mechanisms in nerve cells. Life Sci. 60: 1137-1144.

32. Brown, D., Forward, A. y Marsh, S. (1980) Antagonist discrimination between ganglionic and ileal muscarinic receptors. Br. J. Pharmacol. 71: 362-364.

33. Buckley, N., Bonner, T., Buckley, C. y Brann, M. (1989) Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. Molec. Pharmacol. 35: 469-476.

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

35. Bymaster, F., Heath, I., Hendrix, J., Shannon, H. (1993) Comparative behavioral and neurochemical activities of cholinergic antagonists in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 267: 16-24.

36. Carmeliet, E. y Mubagwa, K. (1986) Desensitization of the acetylcholine-induced increase of potassium conductance in rabbit cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. (Lond.) 371: 239-255.

37. Caulfield, M. (1993) Muscarinic receptors. Characterization, coupling and function. Pharmacol. Ther. 58: 319-379.

38. Caulfield, M. y Brown, D. (1991) Pharmacology of the putative M_4 muscarinic receptor mediating Ca-current inhibition in neuroblastoma x glioma hybrid (NG 108-15) cells. Br. J. Pharmacol. 104: 39-45.

39. Caulfield, M. y Straughan, D. (1983) Muscarinic receptor revisited. Trends Neurosci. 6: 74-76.

40. Cavero, I. y Roach, A. (1980) The pharmacology of prazosin, a novel antihypertensive agent. Life Sci. 27: 1525-1540.

41. Changeux, J., Devilers-Thierry, A. y Chemuivilli, P. (1984) Acetylcholine receptor: an allosteric protein. Science 25: 1335-1345.

42. Cheng, Y. y Prusoff, W. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzimatic reaction. Biochem. Pharmacol. 22: 3099-3108.

43. Chiappinelli, V. (1991) κ-neurotoxins and α-neurotoxins: effects on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. En: Int. Encyclopedia of Pharmacol. Ther. "Snake Toxins" (Ed: A. Harvey). Pergamon Press, N.Y., USA, pp 223-258.

44. Cortés, R. y Palacios, J. (1986) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat brain. I. Quantitative autoradiographic studies. Brain Res. 362: 227-238.

45. Coyle, J., Price, D. y DeLong, M. (1983) Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. Science 219: 1184-1190.

46. Curtis, C., Wheatley, M., Bansal, S., Birdsall, N., Eveleigh, P., Pedder, E., Poyner, D. y Hulme, E. (1989) Propylbenzilylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor. J. Biol. Chem. 264: 489-495.

47. Dajas, F., Cerveñansky, C., Silveira, R. y Barbeito, L. (1988) Fasciculins: some aspects of their anticholinesterase activity in the central nervous system. Neurotoxins in Neurochem. 18: 241-251.

48. Dale, H. (1914) The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 6: 146-190.

49. Darroch, S. y Mitchelson, F. (1995) Characterization of a novel muscarine receptor in avian smooth muscle. Life Sci. 56: abstract 78.

50. Dashwood, M. (1983) Central and peripheral prazosin binding: an in vitro autoradiographic study in the rat. Eur. J. Pharmacol. 86:51-58.

51. De Robertis, E., Alberici, M., Rodríguez de Lorez Arnaiz, G. y Azcurra, J. (1966) Isolation of different types of synaptic membranes from the brain cortex. Life Sci. 5: 577-582.

52. De Robertis, E. D. y De Robertis, E. M. (1988) Biología Celular y Molecular. 11° edición. Ed. El Ateneo, Buenos Aires.

53. Desimone, R. (1992) The physiology of memory: recordings of things past. Science 258: 245-246.

54. De Weille, J., Schweitz, H., Maes, A., Tartar, A. y Lazdunski, M. (1991) Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2437-2440.

55. Dietrich, C. y Kilbinger, H. (1995) Prejunctional M1 and postjunctional M3 muscarinic receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 351: 237-243.

56. Difrancesco, D., Mazzanti, F. y Tromba, C. (1986) Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. J. Physiol. (Lond.) 377: 61-88.

57. Divac, I. (1975) Magnocellular nuclei of the basal forebrain project to neocortex, brain stem, and olfactory bulb. Review of some functional correlates. Brain Res. 93: 385-398.

58. Dörje, F., Levey, A. y Brann, M. (1991a) Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. Mol. Pharmacol. 40: 459-462.

59. Dörje, F., Rettenmayr, N., Mutschler, E. y Lambrecht, G. (1991b) Effect of extracellular calcium concentration on potency of muscarinic agonists at M_1 and M_2 receptors in rabbit vas deferens. Eur. J. Pharmacol. 203: 417-420.

60. Dörje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. y Brann, M. (1991c) Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 256: 727-733.

61. Doxey, J., Roach, A. y Smith, C. (1983) Studies on RX781094: a selective, potent and specific antagonist of α_2-adrenoceptors. Br. J. Pharmacol. 78: 489-505.

62. Ducancel, F., Rowan, E., Cassar, E., Harvey, A., Ménez, A. y Boulain, J. (1991) Amino acid sequence of a muscarinic toxin deduced from the cDNA nucleotide sequence. Toxicon 29: 516-520.

63. Dutar, P. y Nicoll, R. (1988) Classification of muscarinic responses in hippocampus in terms of receptor subtypes and second-messengers systems: Electrophysiological studies in vitro. J. Neurosci. 8: 4214-4224.

64. Eglen, R., Michel, A., Kenny, B. y Whiting, R. (1987) Muscarinic activity of McN-A-343 and its value in muscarinic receptor classification. Brit. J. Pharmacol. 90: 693-700.

65. Eglen, R., Reddy, H., Watson, N. y Challiss, J. (1994) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. Trends Pharmacol. Sci. 15: 114-119.

66. Eglen, R. y Watson, N. (1996) Selective muscarinic receptor agonists and antagonists. Pharmacol. Toxicol. 78: 59-68.

67. Ehlert, F. (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. Mol. Pharmacol. 33: 187-194.

68. Eltze, M. (1988) Muscarinic M_1 and M_2 receptors mediating opposite effects on neuromuscular transmission in rabbit vas deferens. Eur. J. Pharmacol. 151: 205-221.

69. Eltze, M., Gmelin, G., Wess, J., Strohmann, C., Tacke, R., Mutschler, E. y Lambrecht, G. (1988) Presynaptic muscarinic receptors mediating inhibition of neurogenic contractions in rabbit vas deferens are of the ganglionic M_1 type. Eur. J. Pharmacol. 158: 233-242.

70. Endo, T. y Tamiya, N. (1991) Structure-function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. En: Int. Encyclopedia of Pharmacol. Ther. "Snake Toxins" (Ed: A. Harvey). Pergamon Press N.Y., USA, pp 165-222.

71. Enna, S., Bennet, J., Bylund, D., Snyder, S., Bird, E. e Iversen, L. (1976) Alterations of brain neurotransmitter receptor binding in Huntington's chorea. Brain Res. 116: 531-537.

72. Entzeroth, M. y Mayer, N. (1990) Labeling of rat heart muscarinic receptors using the new M_2 selective antagonist [^{3}H]AF-DX 384. Biochem. Pharmacol. 40: 1674-1676.

73. Enz, A., Boddeke, H., Sauter, A., Rudin, M. y Shapiro, G. (1993) SDZ ENS 163, a novel pilocarpine-like drug: pharmacological *in vitro* and *in vivo* profile. Life Sci. 52: 513-520.

74. Fahn, S. (1983) High dosage anticholinergic therapy in dystonia. Neurology 33: 1255-1261.

75. Fahn, S. y Calne, D. (1978) Considerations in the management of Parkinsonism. Neurology 28: 5-7.

76. Ferrari-Dileo, G., Waelbroeck, M., Mash, D. y Flynn, D. (1994) Selective labeling and localization of the M4 (m4) muscarinic receptor subtype. Mol. Pharmacol. 46: 1028-1035.

77. Fibiger, H. (1982) The organization and some projections of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. Brain Res. Rev. 4: 327-388.

78. Fosbraey, P. y Johnson, E. (1980a) Release-modulating acetylcholine receptors on cholinergic neurones of the guinea-pig ileum. Br. J. Pharmacol. 68: 289-300.

79. Fosbraey, P. y Johnson, E. (1980b) Modulation by acetylcholine of the electrically-evoked release of [^{3}H]-acetylcholine from the ileum of the guinea-pig. Br. J. Pharmacol. 69: 145-149.

80. Frey, K. and Howland, M. (1992) Quantitative autoradiography of muscarinic cholinergic receptor binding in the rat brain: distinction of receptor subtypes in antagonist competition assays. J. Pharmacol. Exp. Ther. 263: 1391-1400.

81. Giachetti, A., Micheletti, R. y Montagna, E. (1986) Cardioselective profile of AF-DX 116, a muscarine M_2 receptor antagonist. Life Sci. 38: 1663-1672.

82. Gottesfeld, Z. y Jacobowitz, D. (1979) Cholinergic projections from the septal-diagonal band area to the habenular nuclei. Brain Res. 176: 391-394.

83. Greenwood, F., Hunter, W. y Glover, J. (1963) The preparation of ^{125}I-labelled human growth hormone of high specific radio-activity. Biochem. J. 89: 114-123.

84. Grimm, U., Fuder, H., Moser, U., Baumer, H., Mutschler, E. y Lambrecht, G. (1994a) Characterization of the prejunctional muscarinic receptors mediating inhibition of evoked release of endogenous noradrenaline in rabbit isolated vas deferens. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 349: 1-10.

85. Grimm, U., Moser, U., Mutschler, E. y Lambrecht, G. (1994b) Muscarinic receptor: focus on presynaptic mechanisms and recently developed novel agonists and antagonists. Pharmazie 49: 711-726.

86. Guo, Z., Kameyama, K., Rinken, A. y Haga, T. (1995) Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5) expressed in baculovirus-infected insect cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 274: 378-384.

87. Hagan, J. y Morris, R. (1988) The cholinergic hypothesis of memory: a review of animal experiments. En: Psychopharmacology of the Aging Nervous System (Iversen, L., Iversen, S., Snyder, S., Eds.), Plenum, New York, pp 237-323.

88. Halim, S., Kilbinger, H. y Wessler, I. (1982) Pirenzepine does not discriminate between pre- and postsynaptic muscarinic receptors in the guinea-pig small intestine. Scand. J. Gastroenterol. 17 (Suppl. 72): 87-94.

89. Hall, Z. W. (1987) Three of a kind: the α-adrenergic receptor, the muscarinic acetylcholine receptor, and rhodopsin. Trends Neurosci. 10: 99-101.

90. Hammer, R. y Giachetti, A. (1982) Muscarinic receptor subtypes: M_1 and M_2 biochemical and functional characterization. Life Sci. 31: 2991-2998.

91. Hammer, R., Berrie, C., Birdsall, N., Burgen, A. y Hulme, E. (1980) Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. Nature 283: 90-92.

92. Harris, J. (1991) Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. En: Int. Encyclopedia of Pharmacol. Ther. "Snake Toxins" (Ed: A. Harvey). Pergamon Press N.Y., USA pp 91-129.

93. Harvey, A. (1991) Int. Encyclopedia of Pharmacol. Ther. "Snake Toxins". Pergamon Press.

94. Harvey, A. y Anderson, A. (1985) Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. Pharmacol. Ther. 31: 33-55.

95. Harvey, A., Anderson, A., Mbugua, P. y Karlsson, E. (1984) Toxins from mamba venoms that facilitate neuromuscular transmission. J. Toxicol. Toxin Rev. 3: 91-137.

96. Harvey, A. y Karlsson, E. (1980) Dendrotoxin from the venom of the Green Mamba, *Dendroaspis angusticeps*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 312: 1-6.

97. Harvey, A. y Karlsson, E. (1982) Protease inhibitor homologues from mamba venoms: facilitation of acetylcholine release and interactions with prejunctional blocking toxins. Br. J. Pharmacol. 77: 153-161.

98. Harvey, A. y Karlsson, E. (1984) Polypeptide neurotoxins from mamba venoms that facilitate transmitter release. Trends Pharmacol. Sci. 71-72.

99. Harvey, A., Kornisiuk, E., Bradley, K., Alfaro, P., Cerveñansky, C., Durán, R. y Jerusalinsky, D. (1997) Effects of muscarinic toxins MT1 and MT2 from green mamba venom on tissues containing different subtypes of muscarinic cholinoceptors. Enviado.

100. Hejnová, L., Tuček, S. y El-Fakahany, E. (1995) Positive and negative allosteric interactions on muscarinic receptors. Eur. J. Pharmacol.- Mol. Pharmacol. 291: 427-430.

101. Hider, R., Karlsson, E. y Namiranian, S. (1991) Separation and purification of toxin from snake venoms. En: Int. Encyclopedia of Pharmacol. Ther. "Snake Toxins" (Ed: A. Harvey). Pergamon Press N.Y., USA pp 1-34.

102. Hill, A. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. J. Physiol. 40: iv-vii.

103. Hosey, M. (1992) Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. FASEB J. 6: 845-852.

104. Hulme, E., Birdsall, N. y Buckley, N. (1990) Muscarinic receptor subtypes. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 633-673.

105. Hulme, E., Kurtenbach, E. y Curtis, C. (1991) Muscarinic acetylcholine receptors: structure nad function. Biochem. Soc. Transactions 19: 133-138.

106. Iversen, S. (1997) Behavioural evaluation of cholinergic drugs. Life Sci. 60: 1145-1152.

107. Izquierdo, I. (1989) Mechanism of amnestic action of scopolamine. Trends Pharmacol. Sci. 10: 175

108. Izquierdo, I., Da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. y Medina, J. (1992a) Neurotransmitters receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of the rat. Behav. Neural Biol. 58: 16-26.

109. Izquierdo, I., Medina, J., Jerusalinsky, D. y Da Cunha, C. (1992b) Post-training memory processing in amygdala, septum and hippocampus: role of benzodiazepine/$GABA_A$ receptors, and their interaction with other neurotransmitter systems. Revs. Neurosci. 3: 1-13.

110. Jakubík, J., Bacáková, L., El-Fakahany, E. y Tuček, S. (1995) Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M_1-M_5 muscarinic acetylcholine receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 274: 1077.

111. Jakubík, J. y Tuček, S. (1995) Positive allosteric interactions on cardiac muscarinic receptors: effects of chemical modifications of disulphide and carboxyl groups. Eur. J. Pharmacol. - Mol. Pharmacol. Sect. 289: 311-319.

112. Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C., Abó, V., Raskovsky, S. y Dajas, F. (1991) Muscarinic cholinergic toxins from *Dendroaspis angusticeps* venom. IIIrd International Symposium "Neurotoxins in Neurobiology", IPICS. Piriápolis, Uruguay, 16-20 de Marzo, 1991.

113. Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C., De Robertis, E. y Dajas, F. (1989a) New peptides from *Dendroaspis angusticeps* venom: possihle selective actions on cholinergic muscarinic receptors. 2nd International Symposium "Neurotoxins in Neurobiology". Solís, Uruguay, Diciembre 1988. Toxicon, 1989.

114. Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C., De Robertis, E. y Dajas, F. (1989b) Two new peptides from *Dendroaspis angusticeps* venom: are they muscarinic cholinergic toxins? 12th ISN Meeting, Algarve, Portugal. J. Neurochem. 52 (Suppl.): S92B.

115. Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C., Peña, C., Raskovsky, S. y Dajas, F. (1992a) Two polypeptides from *Dendroaspis angusticeps* venom selectively inhibit the binding of central muscarinic cholinergic receptor ligands. Neurochem. Int. 20: 237-246.

116. Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C., Raskovsky, S., Kornisiuk, E., Bernabeu, R. e Izquierdo, I. (1992b) Muscarinic toxins from *Dendroaspis* venoms. IV Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins (IST), Campinas, Brasil, July 27-31, 1992.

117. Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C., Walz, R., Bianchin, M. e Izquierdo, I. (1993) A peptide muscarinic toxin from the Green Mamba venom shows agonist-like actions in an inhibitory avoidance learning task. Eur. J. Pharmacol. 240: 103-105.

118. Jerusalinsky, D. y Harvey, A. (1994) Toxins from mamba venoms: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. Trends Pharmacol. Sci. 15: 424-430.

119. Jerusalinsky, D., Harvey, A., Karlsson, A. y Potter, L. (1997) The use of muscarinic toxins in the study of muscarinic receptors. Life Sci. 60: 1161-1162.

120. Jerusalinsky, D., Kornisiuk, E., Bernabeu, R., Izquierdo, I. y Cerveñansky, C. (1995) Muscarinic toxins from the venom of *Dendroaspis* snakes with agonist-like actions. Toxicon 33: 389-397.

121. Jerusalinsky, D., Raskovsky, S., Kornisiuk, E., Bernabeu, R. y Cerveñansky, C. (1994) Muscarinic toxins from the venom of elapid snakes. En: "Neurotoxins as Tools in Neurobiology" (Tipton, K., Dajas, F. Eds.), Ellis Horwood.

122. Jerusalinsky, D., Wilkie, G., Wonnacott, S., Cerveñasky, C. y Lunt, G. (1992, comunicación) Efectos de la toxina proteica MTx2 sobre la liberación de acetilcolina de sinaptosomas de hipocampo de rata. VII Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Neuroquímica. 16-18 de Noviembre, 1992. Huerta Grande, Córdoba.

123. Johnston, D., Williams, S., Jaffe, D. y Gray, R. (1992) NMDA-receptor-independent long-term potentiation. Ann. Rev. Physiol. 54: 489-505.

124. Jolkkonen, M., Adem, A., Hellman, U., Werndstedt, C. y Karlsson, E. (1995) A snake toxin against muscarinic acetylcholine receptors: amino acid sequence, subtype specificity and effect on guinea-pig ileum. Toxicon 33: 399-410.

125. Jolkkonen, M., Toomela, T., Rinken, A., Satyapan, N., Jarv, J., Adem, A. y Karlsson, E. (1993) Muscarinic toxins from mamba venoms. Toxicon 31: 524.

126. Jolkkonen, M., van Giersbergen, P., Hellman, U., Wernstedt, C. y Karlsson, E. (1994) A toxin from the green mamba *Dendroaspis angusticeps*: amino acid sequence and selectivity for muscarinic m4 receptors. FEBS Lett. 352: 91-94.

127. Jolkkonen, M., van Giersbergen, P., Hellman, U., Wernstedt, C., Oras, A., Satyapan, N., Adem, A. y Karlsson, E. (1995) Muscarinic toxins from the black mamba *Dendroaspis polylepis*. Eur. J. Biochem. 234: 579-585.

128. Jones, S., Levey, A., Weiner, D., Ellis, J., Novotny, E., Yu, S., Dörje, F., Wess, J. y Brann, M. (1992) Muscarinic acetylcholine receptors. In: "Molecular Biology of G-protein Coupled Receptors", pp 170-197, (Ed:Brann, M.) Birkhauser,Boston

129. Joubert, F. (1985) The amino acid sequence of protein CM-3 from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba). Int. J. Biochem. 17: 695-699.

130. Kamishima, T., Nelson, M. y Patlak, J. (1992) Carbachol modulates voltage sensitivity of calcium channels in bronchial smooth muscle of rats. Am. J. Physiol. 263 (Cell Physiol. 32): C69-C77.

131. Karczmar, A. (1995) Cholinergic substrates of cognition and organism-environment interaction. Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat. 19: 187-211.

132. Karlsson, E. (1979) Chemistry of protein toxins in snake venoms. Handbook of experimental pharmacology. En: "Snake Venoms" 52: 159-212 (Lee, C., Ed.), Springer, Berlin.

133. Karlsson, E., Jolkkonen, M., Satyapan, N., Adem, A., Kumlin, E., Hellman, U. y Wernstedt, C. (1994) Protein toxins that bind to muscarinic acetylcholine receptors. En: "Toxins and Exocytosis" (Suput, D., Zorec, R., Ed.) N.Y.Acad.Sci. 153-161.

134. Karlsson, E., Mbugua, P. y Rodríguez-Ithurralde, D. (1984) Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. J. Physiol. Paris 79: 232-240.

135. Karlsson, E., Mbugua, P. y Rodriguez-Ithurralde, D. (1985) Anticholinesterase toxins. J. Physiol. Paris 79: 232-240.

136. Karlsson, E., Risinger, C., Jolkkonen, M., Wernstedt, C. y Adem, A. (1991) Amino acid sequence of a snake venom toxin that binds to the muscarinic acetylcholine receptor. Toxicon 29: 521-526.

137. Kawashima, K., Fujimoto, K., Suzuki, T. y Oohata, H. (1988) Direct determination of acetylcholine release by radioimmunoassay and presence of presynaptic M_1 muscarinic receptors in guinea pig ileum. J. Pharmacol. Exp. Ther. 244: 1036-1039.

138. Kawashima, K., Fujimoto, K., Suzuki, T. y Oohata, H. (1990) Pharmacological differentiation of presynaptic M_1 muscarinic receptors modulating acetylcholine release from postsynaptic muscarinic receptors in guinea-pig ileum. Gen. Pharmacol. 21: 17-21.

139. Kenakin, T., Bond, R. y Bonner, T. (1992) Definition of pharmacological receptors. Pharmacol. Rev. 44: 351-362.

140. Kievit, J. y Kuypers, H. (1975) Basal forebrain and hypothalamic connections to frontal and parietal cortex in the rhesus monkey. Science 187: 660-662.

141. Kilbinger, H. (1977) Modulation by oxotremorine and atropine of acetylcholine release evoked by electrical stimulation of the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 300: 145-151.

142. Kilbinger, H. (1984) Facilitation and inhibition by muscarinic agonists of acetylcholine release from guinea-pig myenteric neurones: mediation through different types of neuronal muscarinic receptors. Trends Pharmacol. Sci. 5 (Suppl.): 49-52.

143. Kilbinger, H. (1985) Subtypes of muscarinic receptors modulating acetylcholine release from myenteric nerves. En: Muscarinic Receptor Subtypes in the GI Tract (Lux, G. y Daniel, E., Eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp 37-42.

144. Kilbinger, H., Halim, S., Lambrecht, G., Weiler, W. y Wessler, I. (1984) Comparison of affinities of muscarinic antagonists to pre- and postjunctional receptors in the guinea-pig ileum. Eur. J. Pharmacol. 103: 313-320.

145. Kilbinger, H. y Nafziger, M. (1985) Two types of neuronal muscarine receptors modulating acetylcholine release from guinea-pig myenteric plexus. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 328: 304-309.

146. Kilbinger, H. y Wagner, P. (1975) Inhibition by oxotremorine of acetylcholine resting release from guinea-pig ileum longitudinal muscle strips. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 287: 47-60.

147. Kilbinger, H. y Wessler, I. (1980) Pre- and postsynaptic effects of muscarinic agonists in the guinea-pig ileum. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 314: 259-266.

148. Kim, D. (1993) Mechanism of rapid desensitization of muscarinic K^+ current in adult rat and guinea pig atrial cells. Circ. Res. 73: 89-97.

149. Kölliker, A. (1896) Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Vol. 2. Nervensystem. Engelmann, Leipzig. pp 874.

150. Kopelman, M. (1986) The cholinergic neurotransmitter system in human memory and dementia: review. Q. J. Exp. Psychol. [A] 38: 535-573.

151. Kornisiuk, E., Cerveñansky, C., Alfaro, P., Bassarsky, M., Harvey, A. y Jerusalinsky, D. (1995a) Peptide muscarinic toxins with agonist activity that preferentially bind to the m1 receptor subtype. Comunicaciones Biológicas 13: 123-133.

152. Kornisiuk, E., Cerveñansky, C., Durán, R., Alfaro, P., Alonso, M. y Jerusalinsky, D. (1996a) Nuevas toxinas muscarínicas del veneno de *Dendroaspis viridis*. XI Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Neuroquímica, La Cumbrecita, Córdoba, 24-26 de Octubre 1996.

153. Kornisiuk, E., Cerveñansky, C., Durán, R., Alfaro, P., Alonso, M. y Jerusalinsky, D. (1996b) New muscarinic toxins from *D. viridis* venom. 7th International Symposium: Subtypes of Muscarinic Receptors. Vienna, USA, 12-15 de Noviembre 1996.

154. Kornisiuk, E., Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C. y Harvey, A. (1995b) Binding of muscarinic toxins MTx1 and MTx2 from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* to cloned human muscarinic cholinoceptors. Toxicon 33: 11-18.

155. Kornisiuk, E., Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C. y Harvey, A. (1995c) Binding of muscarinic toxins MTx1 and MTx2 from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* to cloned human muscarinic cholinoceptors. Corrigendum. Toxicon 33: 1111.

156. Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takashashi, H., Mishina, M., Haya, T., Haga, K., Ichigama, A., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. y Numa, S. (1986a) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. Nature 323: 411-416.

157. Kubo, T., Maeda, A., Sugimoto, K., Akiba, I., Takahashi, H., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T. Y Numa, S. (1986b) Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. FEBS Lett. 209: 367-372.

158. Kurachi, Y., Nakajima, T. y Sugimoto, T. (1986) Acetylcholine activation of K channels in cell-free membrane of atrial cells. Am. J. Physiol. 251: H681-H684.

159. Lambert, D. y Nahorski, S. (1992) Carbachol-stimulated calcium entry in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: Which route? J. Physiol. (Paris) 86: 77-82.

160. Lambrecht, G., Feifel, R., Moser, U., Wagner-Roder, M., Choo, L., Camus, J., Tastenoy, M., Waelbroeck, M., Strohmann, C., Tacke, R., Rodrigues de Miranda, J., Christophe, J. y Mutschler, E. (1989a) Pharmacology of hexahydro-difenidol, hexahydro-sila-difenidol and related selective muscarinic antagonists. Trends Pharmacol. Sci. 10 (Suppl.): 60.

161. Lambrecht, G., Feifel, R., Wagner-Roder, M., Strohmann, C., Zilch, H., Tacke, R., Waelbroeck, M., Christophe, J., Boddeke, H. y Mutschler, E. (1989b) Affinity profiles of hexahydro-sila-difenidol analogues at muscarinic receptor subtypes. Eur. J. Pharmacol. 168: 71-80.

162. Lazareno, S. y Roberts, F. (1989) Functional and binding studies with muscarinic M_2-subtype selective antagonists. Br. J. Pharmacol. 98: 309-317.

163. Lazareno, S., Buckley, N. y Roberts, F. (1990) Characterization of muscarinic M_4 binding sites in rabbit lung, chicken heart and NG 108-15 cells. Molec. Pharmacol. 38: 805-815.

164. Le Du, M., Marchot, P., Bougis, P. y Fontecilla-Camps, J. (1992) 1.9-Å resolution structure of fasciculin 1, an anti-acetylcholinesterase toxin from green mamba snake venom. J. Biol. Chem. 267: 22,122-22,130.

165. Lee, N. y El-Fakahany, E. (1991a) Allosteric antagonists of the muscarinic acetylcholine receptor. Biochem. Pharmacol. 42: 199-205.

166. Lee, N. y El-Fakahany, E. (1991b) Allosteric interactions at the m1, m2 and m3 muscarinic receptor suhtypes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 256: 468-479.

167. Levey, A. (1993) Immunological localization of M_1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. Life Sci. 52: 441-443.

168. Levey, A., Kitt, C., Simonds, W., Price, D. y Brann, M. (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. J. Neurosci. 11: 3218-3226.

169. Lewis, P. y Shute, C. (1967) The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. Brain 90: 521-540.

170. Loëwi, O. (1921) Uber humorole übertragbarkeit der herznervenwirkung. I. Mitteilung. Plfügers Arch. Gesamte Physiol. 189: 239-242.

171. Low, B., Preston, H., Sato, A., Rosen, L., Searl,J., Rudko, A. y Richardson, J. (1976) Three dimensional structure of erabutoxin b neurotoxic protein: inhibitor of acetylcholine receptor. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 73: 2991-2994.

172. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. y Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

173. Lundy, P., Frew, R., Fuller, T. y Hamilton, M. (1991) Pharmacological evidence of a μ-conotoxin binding molecule in rat brain synaptosomes and cultured neurons. Mol. Pharmacol. 34: 87.

174. Maeda, T., Kaneko, S. y Satoh, M. (1993) Bidirectional modulation of long-term potentiation by carbachol via M_1 and M_2 muscarinic receptors in guinea pig hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. Brain Res. 619: 324-330.

175. Markram, H. y Segal, M. (1990) Long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine. J. Physiol. 427: 381-393.

176. Markram, H. y Segal, M. (1992) The inositol 1, 4, 5-trisphosphate pathway mediates cholinergic potentiation of rat hippocampal neuronal responses to NMDA. J. Physiol. 447: 513-533.

177. Mash, D. y Potter, L. (1986) Autoradiographic localization of M_1 and M_2 muscarinic receptors in the rat brain. Neuroscience 19: 551-564.

178. Mathie, A., Bernheim, L. y Hille, B. (1992) Inhibition of N- and L-type calcium channels by muscarinic receptor activation in rat sympathetic neurons. Neuron 8: 907-914.

179. Matsui, H., Lazareno, S. y Birdsall, N. (1995) Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. Mol. Pharmacol. 47: 88.

180. Maturana, H. y Varela, F. (1984) El Árbol del Conocimiento, las Bases Biológicas del Entendimiento Humano. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, Chile, 172 pp.

181. Max, S., Liang, J. y Potter, L. (1993a) Purification and properties of m1-toxin, a specific antagonist of m1 muscarinic receptors. J. Neurosci. 13: 4292-4300.

182. Max, S., Liang, J. y Potter, L. (1993b) Stable allosteric binding of m1-toxin to m1 muscarinic receptors. Mol. Pharmacol. 44: 1171-1175.

183. Max, S., Liang, J., Valentine, H. y Potter, L. (1993c) Use of m1-toxin as a selective antagonist of m1 muscarinic receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 267: 480-485.

184. Max, S., Liang, J., Purkenson, S. y Potter, L. (1993d) m4-Toxin, a selective, reversible, allosteric antagonist of m4 muscarinic receptors. Neurosci. Abstr. 19: 462.

185. McDowell, R., Dennis, M., Louie, A., Shuster, M., Mulkerrin, M. y Lazarus, R. (1992) Mambin, a potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. Biochemistry 31: 4766-4772.

186. Mebs, D. y Claus, I. (1991) Apendix: Amino acid sequences and toxicities of snake venom components. En: Int. Encyclopedia of Pharmacol. Ther. "Snake Toxins" (Ed: A. Harvey). Pergamon Press, N.Y., USA, pp 425-447.

187. Medina, J. e Izquierdo, I. (1995) Retrograde messengers, long term potentiation and memory. Brain Res. Rev. 21: 185-194.

188. Mengden, G. (1983) The taxonomy of Australian elapid snakes: A review. Records Australian Museum 35: 195-222.

189. Méry, P., Abi-Gerges, N., Vandecasteele, G., Jurevicius, J., Eschenhagen, T. y Fischmeister, R. (1997) Muscarinic regulation of the L-type calcium current in isolated cardiac myocytes. Life Sci. 60: 1113-1120.

190. Mesulam, M. y van Hoesen, G. (1976) Acetylcholinesterase-rich projections from the basal forebrain of the rhesus monkey to neocortex. Brain Res. 109: 152-157.

191. Mesulam, M., Mufson, E., Levey, A. y Wainer, B. (1983a) Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. J. Comp. Neurol. 214: 170-197.

192. Mesulam, M., Mufson, E., Levey, A. y Wainer, B. (1984) Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. Neuroscience 12: 669-686.

193. Mesulam, M., Mufson, E., Wainer, B. y Levey, A. (1983b) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). Neuroscience 10: 1185-1201.

194. Meynert, T. (1872) Vom gehirn der säugetiere. In: Handbuch der Lehre von den Geweben des Menschen und der Tiere, vol. 2, Stricker S, Leipzig.

195. Mickala, P., Boutin, H., Bellanger, C., Chevalier, C., MacKenzie, E. y Dauphin, F. (1996) *In vivo* binding, pharmacokinetics and metabolism of the selective M_2 muscarinic anatagonists [^{3}H]AF-DX 116 and [^{3}H]AF-DX 384 in the anesthetized rat. Nucl. Med. Biol. 23: 173-179.

196. Michel, A., Stefanich, E. y Whiting, R. (1989) Direct labeling of rat M_3 muscarinic receptors by [^{3}H]4-DAMP. Eur. J. Pharmacol. 166: 459-466.

197. Micheletti, R., Giudici, L., Turconi, M. y Donetti, A. (1990) 4-DAMP analogues reveal heterogeneity of M_1 muscarinic receptors. Br. J. Pharmacol. 100: 395-397.

198. Micheletti, R., Montagna, E. y Giachetti, A. (1989) AF-DX 116, a cardioselective antagonist. J. Pharmacol. Exp. Ther. 241: 621-634.

199. Miller, J., Gibson, V. y McKinney, M. (1991) Binding of [^{3}H]AF-DX 384 to cloned and native muscarinic receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 259: 601-607.

200. Miranda, H., Durán, E., Bustamante, D., Paeile, C. y Pinardi, G. (1994) Pre- and postjunctional muscarinic receptor subtypes in the vas deferens of rat. Gen. Pharmacol. 25: 1643-1647.

201. Mitchelson, F. (1988) Muscarinic receptor differentiation. Pharmacol. Ther. 37: 357-423.

202. Mohr, K. y Tränkle, C. (1994) Allosteric effects of the alkane-bis-ammonium compound W84 and of tacrine on [^{3}H]pirenzepine binding at M_1-receptors in rat cerebral cortex. Pharmacol. Toxicol. 75: 391.

203. Moltzen, E. y Bjornholm, K. (1995) Medicinal chemistry of muscarinic agonist: developments since 1990. Drugs of the Future 20: 37-54.

204. Morita, K., North, R. y Tokimasa, T. (1982) Muscarinic presynaptic inhibition of synaptic transmission in myenteric plexus of guinea-pig ileum. J. Physiol. (Lond.) 333: 141-149.

205. Morrow, A. y Creese, I. (1986) Characterization of α_1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: reevaluation of [^{3}H]WB 4101 and [^{3}H]prazosin binding. Mol. Pharmacol. 29: 321.

206. Narang, N. (1995) In situ determination of M_1 and M_2 muscarinic receptor binding sites and mRNAs in young and old rat brains. Mechan. Ageing Develop. 78: 221-239.

207. Nathanson, N. (1987) Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. Ann. Rev. Neurosci. 10: 195-236.

208. Nieuwenhuys, R. (1985) Chemoarchitecture of the Brain. Springer-Verlag Berlin, Alemania. 246 pp.

209. Nilsson, B., De Boer, P., Grol, C. y Hacksell, U. (1992) An improved synthesis of the enantiomers of BM-5 and their effects on the central in vivo release of acetylcholine. Chirality 4: 367-376.

210. Nilsson, B., Vargas, H. y Hacksell, U. (1992) Amide, urea and carbamate analogues of the muscarinic agent [4-[[N-(3-chlorophenyl) carbamoyl] oxy]-2-butynyl] trimethylammonium chloride. J. Med. Chem. 35: 2787-2798.

211. North, R. (1989) Muscarinic cholinergic receptor regulation of ion channels. En: "The Muscarinic Receptors" Ed: J. Brown, Humana Press, New Jersey, pp 341-346.

212. Offermanns, S., Gollasch, M., Hescheler, J., Spicher, K., Schmidt, G. y Rosenthal, W. (1991) Inhibition of voltage-dependent Ca^{2+} currents and activation of pertussis toxin-sensitive G-protein via muscarinic receptors in GH_3 cells. Mol. Endocrinol. 5: 995-1002.

213. Olianas, M., Adem, A., Karlsson, E. y Onali, P. (1996) Rat striatal muscarinic receptors coupled to the inhibition of adenylyl cyclase activity: potent block by the selective m4 ligand muscarinic toxin 3 (MT3). Brit. J. Pharmacol. 118: 283-288.

214. Osborne, R. (1996) Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. Pharmacol. Ther. 69: 117-142.

215. Othman, O., Ismail, M. y El-Asmar, M. (1973) Pharmacological studies of snake (*Dendroaspis angusticeps*) venom. Toxicon 11: 185-192.

216. Parker, E., Kameyama, K., Higashijima, T. y Ross, E. (1991) Reconstitutively active G protein-coupled receptors purified from baculovirus-infected insect cells. J. Biol. Chem. 266: 519-527.

217. Paxinos, G. y Watson, C. (1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press, 263 pp.

218. Paxinos, G. y Watson, C. (1997) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 2da ed. New York: Academic Press, 263 pp.

219. Pfaffinger, P., Martin, J., Hunter, D., Nathanson, N. y Hille, B. (1985) GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. Nature 317: 536-538.

220. Quaglia, W., Giardina, D. y Marucci, G. (1991) Structure-activity relationships among methoctramine-related polymethylene tetraamines. Farmaco 46: 417-434.

221. Quattrochi, J., Mamelak, A., Madison, R., Macklis, J. y Hobson, J. (1989) Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol-fluorescent microspheres. Science 245: 984-986.

222. Quirion, R., Araujo, D., Regenold, W. y Boksa, P. (1989) Characterization and quantitative autoradiographic distribution of [^{3}H]acetylcholine muscarinic receptors in mammalian brain. Aparent labelling of an M_2-like receptor sub-type. Neuroscience 29: 271-289.

223. Raghavendra Rao, V., Mousseau, D. y Butterworth, R. (1995) A quantitative autoradiographic study of muscarinic cholinergic receptor subtypes in the brains of pyrithiamine-treated rats. Neurochem. Res. 20: 907-914.

224. Raskovsky, S., Aguilar, J., Jerusalinsky, D. y De Robertis, E. (1988) A ^{3}H-oxotremorine binding method reveals regulatory changes by guanine nucleotides in cholinergic muscarinic receptors of cerebral cortex. Neurochem. Res. 13: 525-530.

225. Re, L., Cola, V., Fulgenzi, G., Marinelli, F., Concettoni, C. y Rossini, L. (1993) Postsynaptic effects of methoctramine at the mouse neuromuscular junction. Neuroscience 57: 451-457.

226. Rees, B., Samma, J., Thierry, J., Gilibert, M., Fisher, J., Schweitz, H., Lazdunski, M. y Moras, D. (1987) Crystal structure of a snake venom cardiotoxin. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 84: 3132-3136.

227. Reever, C., Ferrari-DiLeo, G. y Flynn, D. (1997) The M5 (m5) receptor subtype: fact or fiction? Life Sci. 60: 1105-1112.

228. Richards, M. y van Giersbergen, P. (1995) Human muscarinic receptors expressed in A9L and CHO cells: activation by full and partial agonists. Brit. J. Pharmacol. 114: 1241-1243.

229. Rodríguez-Ithurralde, D., Silveira, R., Barbeito, L. y Dajas, F. (1983) Fasciculin, a powerful anticholinesterase polypeptide from *Dendroaspis angusticeps* venom. Neurochem. Int. 5: 267-274.

230. Ruberg, M., Javoy-Agid, F., Hirsch, E., Scatton, B., Lheureux, R., Hauw, J., Duyckaerts, C., Gray, F., Morel-Maroger, A., Rascol, A., Serdaru, M. y Agid, Y. (1985) Dopaminergic and cholinergic lesions in progressive supranuclear palsy. Ann. Neurol. 18: 523-529.

231. Ruberg, M., Ploska, A., Javoy-Agid, F. y Agid, Y. (1982) Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in Parkinsonian subjects with reference to dementia. Brain Res. 232: 129-139.

232. Sakmann, B., Noma, A. y Trautwein, W. (1983) Acetylcholine activation of single muscarinic K channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. Nature 303: 250-253.

233. Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660-672.

234. Schwartz, R., Davis, R., Jean, J., Spencer, C., Tecle, H. y Thomas, A. (1993) Characterization of muscarinic agonists in recombinant cell lines. Life Sci. 52: 465-472.

235. Schweitz, H., Heurteaux, C., Bois, P., Moinier, D., Romey, G. y Lazdunski, M. (1994) Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca^{2+} channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 878-882.

236. Segal, M. y Auerbach, J. (1997) Muscarinic receptors involved in hippocampal plasticity. Life Sci. 60: 1085-1091.

237. Ségalas, I., Roumestand, C., Zinn-Justin, S., Gilquin, B., Ménez, R. y Toma, F. (1995a) Solution structure of a green mamba toxin that activates muscarinic acetylcholine receptors, as studied by nuclear magnetic resonance and molecular modeling. Biochemistry 34: 1248-1260.

238. Ségalas, I., Thai, R., Ménez, R. y Vita, C. (1995b) A particularly labile Asp-Pro bond in the green mamba muscarinic toxin MTX2. Effect of protein conformation on the rate of cleavage. FEBS Lett. 371: 171-175.

239. Sharma, V., Colecraft, H., Rubin, L. y Sheu, S-S. (1997) Does mammalian heart contain only the M2 muscarinic receptor subtype? Life Sci. 60: 1023-1029.

240. Shute, C. y Lewis, P. (1967) The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. Brain 90: 497-520.

241. Sitaram, N., Mendelson, W., Wyatt, R. y Gillin, J. (1977) Time dependent induction of REM sleep and arousal by physostigmine infusion during normal human sleep. Brain Res. 122: 562-567.

242. Skok, V., Selyanko, A. y Derkach, V. (1989) General characteristics of neuronal acetylcholine receptors. In: Neuronal Acetylcholine Receptors (Consultants Bureau, Eds.), Consultants Bureau, New York, pp 1-21.

243. Soejima, O., Katsuragi, T. y Furukawa, T. (1993) Opposite modulation by muscarinic M_1 and M_3 receptors of acetylcholine release from guinea pig ileum as measured directly. Eur. J. Pharmacol. 249: 1-6.

244. Spalding, T., Birdsall, N.,Curtis, C. y Hulme, E. (1994) Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. J. Biol. Chem. 269: 4092-4097.

245. Stockton, J., Birdsall, N., Burgen, A. y Hulme, E. (1983) Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. Mol. Pharmacol. 23: 551-557.

246. Sweetnam, P., Caldwell, L., Lancaster, J., Bauer, C., McMillan, B., Kinnier, W. y Price, C. (1993) The role of receptor binding in drug discovery. J. Natural Products 56: 441-455.

247. Szerb, J. (1980) Effect of low calcium and oxotremorine on the kinetics of the evoked release of [^{3}H]acetylcholine from the guinea-pig myenteric plexus; comparison with morphine. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311: 119-127.

248. Trimmer, B. (1995) Current excitement from insect muscarinic receptors. Trends Neurosci. 18: 104-111.

249. Tsernoglu, D. y Petsko, G. (1976) Three-dimensional structure of a postsynaptic neurotoxin from sea snake at 2.2 Å resolution. FEBS Lett. 68: 1-4.

250. Tuček, S. y Proška, J. (1995) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. Trends Pharmacol. Sci. 16: 205-212.

251. Tuček, S., Proška, J., Hejnová, L. y El-Fakahany, E. (1995) Allosteric interactions between alcuronium and ligands binding to the classical binding site on cardiac muscarinic receptors. Life Sci. 56: 1009.

252. van Ginneken, A. y Giles, W. (1991) Voltage clamp measurements of the hyperpolarization-activated inward current I_f in single cells from rabbit sino-atrial node. J. Physiol. (Lond.) 434: 57-83.

253. Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M-C., Rathé, J., Waelbroeck, M., Jolkkonen, M., Oras, A. y Karlsson, E. (1995) Purification and sequence determination of a new muscarinic toxin (MT4) from the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). Toxicon 33: 1171-1179.

254. Vilaró, M., Palacios, J. y Mengod, G. (1994) Multiplicity of muscarinic autoreceptor subtypes? Comparison of the distribution of cholinergic cells and cells containing mRNA for five subtypes of muscarinic receptors in the rat brain. Mol. Brain Res. 21: 30-40.

255. Vnek, N. y Rothblat, L. (1996) The hippocampus and long-term object memory in the rat. J. Neurosci. 16: 2780-2787.

256. Waelbroeck, M., Camus, J. y Christophe, J. (1989) Determination of the association and dissociation rate constants of muscarinic antagonists on rat pancreas: rank order of potency varies with time. Mol. Pharmacol. 36: 405-411.

257. Waelbroeck, M., Camus, J., Winand, J. y Christophe, J. (1987a) Different antagonist binding properties of rat pancreatic and cardiac muscarinic receptors. Life Sci. 41: 2235-2240.

258. Waelbroeck, M., De Neef, P., Domenach, V., Vandermeers-Piret, M. y Vandermeers, A. (1996) Binding of the labelled muscarinic toxin ^{125}I-MT1 to rat brain muscarinic M_1 receptors. Eur. J. Pharmacol. 305: 187-192.

259. Waelbroeck, M., Gillard, M., Robberecht, P. y Christophe, J. (1987b) Muscarinic receptor heterogeneity in rat central nervous system. I. Binding of four selective antagonists to three muscarinic receptor subclasses. A comparison with M_2 cardiac muscarinic receptor of the C type. Mol. Pharmacol. 32: 91-99.

260. Waelbroeck, M., Tastenoy, M., Camus, J. y Christophe, J. (1990) Binding of selective antagonists to four muscarinic receptors (M_1 to M_4) in rat forebrain. Mol. Pharmacol. 38: 267-273.

261. Waelbroeck, M., Tastenoy, M., Camus, J. y Christophe, J. (1991) Binding kinetics of quinuclidinyl benzilate and methyl-quinuclidinyl benzilate enantiomers at neuronal (M_1), cardiac (M_2), and pancreatic (M_3) muscarinic receptors. Mol. Pharmacol. 40: 413-420.

262. Wall, S., Yasuda, R., Hory, F., Flagg, S., Martin, B., Ginns, E. y Wolfe, B. (1991a) Production of antisera selective for m1 muscarinic receptors using fusion proteins: distribution of m1 receptors in rat brain. Mol. Pharmacol. 39: 643-649.

263. Wall, S., Yasuda, R., Li, M. y Wolfe, B. (1991b) Development of an antiserum against m3 muscarinic receptors: distribution of m3 receptors in rat tissues and clonal cell lines. Mol. Pharmacol. 40: 783-789.

264. Wastek, G. y Yamamura, H. (1978) Biochemical characterization of the muscarinic cholinergic receptor in human brain: Alterations in Huntington's disease. Mol. Pharmacol. 14: 768-780.

265. Watson, N., Reddy, H. y Eglen, R. (1995) The role of muscarinic M_2 and M_3 receptors in guinea-pig isolated trachea: effects of selective muscarinic receptor alkylation. Eur. J. Pharmacol. 278: 195-201.

266. Weiner, N. y Taylor, P. (1985) Drugs acting at sinaptic and neuroeffector junctional sites. En: Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics. (Gilman, A., Goodman, L., Rall, T., Murad, F. Eds) New York: Mac Millan, pp 66-235.

267. Weiner, D., Levey, A. y Brann, M. (1990) Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. Proc. natn. Acad. Sci. USA 87: 7050-7054.

268. Welsh, J. (1967) Acetylcholine in snake venoms. En: Animal Toxins (Ed: Russel, F. y Saunders, P.) Pergamon Press, NY, USA, pp 363-368.

269. Wess, J. (1993a) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. Trends Pharmacol. Sci. 14: 308-313.

270. Wess, J. (1993b) Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions. Life Sci. 53: 1447-1463.

271. Wess, J., Bonner, T. y Brann, M. (1990) Chimeric m2/m3 muscarinic receptors: role of carboxyl terminal receptor domains in selectivity of ligand binding and coupling to phosphoinositide hydrolysis. Mol. Pharmacol. 38: 872-877.

272. Wess, J., Goula, D. y Brann, M. (1992) Structural basis of the subtype selectivity of muscarinic antagonists: a study with chimeric m2/m5 muscarinic receptors. Mol. Pharmacol. 41: 369-374.

273. Whitehouse, P., Price, D., Clark, A., Coyle, J. y DeLong, M. (1981) Alzheimer's disease: Evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. Ann. Neurol. 10: 122-126.

274. Yamamura, H. y Snyder, S. (1974a) Muscarinic cholinergic binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 1725-1729.

275. Yamamura, H. y Snyder, S. (1974b) Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum with [^{3}H]quinuclidinyl benzilate. Molec. Pharmacol. 10: 861-867.

276. Yamamura, H., Enna, S. y Kuhar, M. (1978) Neurotransmitter Receptor Binding. Raven Press, New York.

277. Yasuda, R., Ciesla, W., Flores, L., Wall, S., Li, M., Satkus, S., Weisstein, J., Spagnola, B. y Wolfe, B. (1993) Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. Mol. Pharmacol. 43: 149-157.

278. Young, J., Hiley, C. y Burgen, A. (1972) Homologues of benzilylcholine mustard. J. Pharm. Pharmacol. 24: 950-954.

279. Zorn, S., Jones, S., Ward, K. y Liston, D. (1994) Clozapine is a potent and selective muscarinic M_4 agonist. Eur. J. Pharmacol. 269: R1-R2.