



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales

**RECEPTORES MUSCARINICOS CENTRALES PARA
ACETILCOLINA: PARTICIPACION DE SUBTIPOS EN
LA TRANSDUCCION DE SEÑALES Y SU ROL EN EL
PROCESAMIENTO DE INFORMACION**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Ciencias Biológicas

Autor

Lic. Gonzalo M. Sánchez

Directores

Dra. Diana Jerusalinsky

Dr. Edgar Kornisiuk

Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. E. De Robertis” Facultad de
Medicina, Universidad de Buenos Aires
Ciudad Autónoma de Buenos Aires

- 2007 -

Resumen

En el presente trabajo se intenta establecer el papel de ciertos subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos, con especial atención respecto al receptor M4, en algunas funciones cerebrales que van desde la modulación de reacciones enzimáticas hasta efectos sobre la retención de la memoria en determinados ensayos de comportamiento.

Debido a la falta de agentes farmacológicos selectivos por RACHM, un objetivo complementario fue el de ampliar la caracterización de algunas de las toxinas muscarínicas, péptidos extraídos del veneno de serpientes Mamba, de forma de poder emplearlas en el estudio discriminado de los receptores muscarínicos.

Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de receptores metabotrópicos con siete segmentos de transmembrana, cuya participación en la señalización intracelular está mediada por las proteínas G. Han sido identificados cinco subtipos, todos presentes en el sistema nervioso central: los receptores M2 y M4 principalmente promueven la inhibición de la adenilato ciclasa por intermedio de G_i , en tanto que los subtipos M1, M3 y M5 estimulan la fosfolipasa C a través de G_q . La acción de los receptores muscarínicos también puede ser mediada por otros tipos de proteína G, que tienen efecto sobre canales iónicos, y así pueden alterar el potencial de membrana neuronal.

Se ha demostrado la participación de los receptores muscarínicos en diferentes modelos de plasticidad sináptica y en varias formas de aprendizaje y memoria, aunque el rol de cada subtipo no se distingue claramente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que, en ensayos de actividad enzimática, los receptores M4 son responsables exclusivos de la inhibición muscarínica de la síntesis de AMPc en estriado y en hipocampo, mientras que en amígdala no pareciera haber participación muscarínica detectable en la señalización de este segundo mensajero. También se estimó la proporción de subtipos de receptores muscarínicos en estas tres estructuras mediante experimentos de inhibición de la fijación específica por las toxinas muscarínicas.

En experimentos de electrofisiología se puso de manifiesto un rol excitatorio de M1 y M4 en neuronas piramidales de CA1, como también se evidenció la participación de M4 en un modelo de plasticidad sináptica.

En ensayos de comportamiento se comprobó un rol positivo de M4 en la consolidación, mientras que el mismo receptor tuvo un efecto opuesto en la evocación: se bloqueó selectivamente al M4 inmediatamente después del entrenamiento en una tarea de evitación inhibitoria y justo antes de la sesión de prueba, alternativamente. En el primer caso se produjo amnesia, mientras que en el segundo, se observó un efecto facilitatorio.

Abstract

In the present work we attempt to establish the role of certain subtypes of muscarinic cholinergic receptors, especially the M4, in relation to their involvement in some relevant brain functions, ranging from intracellular signalling to behavior.

Due to the lack of selective ligands, a complementary objective in this study was to clarify the pharmacological profile of some muscarinic toxins, peptides extracted from mamba snake's venom with high degree of discrimination among muscarinic receptors.

Muscarinic receptors belong to the metabotropic receptor group, whose contribution in intracellular signaling is mediated by G proteins. Five different subtypes have been cloned, all of them expressed in the brain: M2 and M4 receptors main function is the inhibition of adenylyl cyclase activity by means of Gi, while M1 M3 and M5 receptors promote phospholipase C activation through Gq.

Among other targets, muscarinic receptors control ionic channels' permeability and thus modulate neuronal excitability.

The recruitment of muscarinic receptors has been shown in different models of synaptic plasticity and in a variety of learning and memory paradigms, even though the precise role of each subtype remains elusive.

Results reported here demonstrate that M4 receptors are the major regulators of cAMP synthesis in hippocampus and striatum, while no such regulation could be established in amygdala. Muscarinic receptor subtypes composition in these structures was also estimated using binding assays.

In electrophysiological recordings from hippocampal CA1 region pyramidal neurons M1 and M4 receptors could be related to an enhancement of the glutamatergic transmission in the Schaffer collaterals-CA1 synapse. Furthermore, the selective blockade of M4 prevented potentiation in two different procedures for LTP induction.

In line with these findings, M4 appeared to have a positive role in memory consolidation, since its antagonism produced amnesia. On the other hand, the blockade of M4 during retrieval was facilitatory, suggesting a plastic reversion of function driven by experience.

Objetivos

El objetivo general del presente estudio estuvo enfocado en el intento de esclarecer el rol de los diferentes subtipos de RACHM en el funcionamiento del cerebro de mamíferos, particularmente en relación a los procesos de aprendizaje y memoria. Ante la carencia de agentes farmacológicos lo suficientemente selectivos para subtipos de RACHM, complementariamente al objetivo general, nos propusimos profundizar el estudio de las MTs en cuanto a su potencial como herramientas para el estudio diferencial de los RACHM.

Establecido el marco de referencia, el estudio se basó en las cuatro aproximaciones independientes y complementarias que se detallan a continuación.

A nivel de la localización de subtipos de receptores, con un abordaje bioquímico, nos propusimos estudiar la proporción de los RACHM en diferentes estructuras del sistema nervioso central involucradas en aprendizaje y memoria, aprovechando la selectividad de las MTs mejor caracterizadas (experimentos de inhibición de la fijación específica en membranas sinaptosomales de cerebro de rata).

Por otro lado, a nivel de la transducción de señales, nos planteamos estudiar la participación de los RACHM en el control de la síntesis de AMPc en las correspondientes estructuras centrales y, conjuntamente, determinar el carácter agonista o antagonista de las toxinas (ensayos de actividad de Adenilato Ciclasa en membranas sinaptosomales de cerebro de rata).

A nivel de transmisión sináptica, con un abordaje electrofisiológico, comenzamos el análisis de la modulación, por parte de los RACHM, de la actividad eléctrica evocada en el hipocampo, con especial atención a los fenómenos de plasticidad sináptica (registros de potencial de campo y registros por fijación de voltaje en rodajas de hipocampo de rata).

A nivel comportamental evaluamos el rol de los RACHM sobre la consolidación y la evocación de la memoria en un paradigma de evitación inhibitoria.

Introduccion

Presentación

La memoria es un concepto presente cotidianamente, que es fundamental en nuestras vidas, así como en la de los demás animales. Cualquier persona puede fácilmente ilustrar qué es o de qué se trata la memoria y también puede mencionar casos en los que el recuerdo falla, incluso los que se evidencian en cuadros patológicos. Basta tener en cuenta que, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, una patología de alta incidencia especialmente después de los 50 años y que cada vez afecta a un mayor porcentaje de la población mundial, altera las capacidades cognitivas, especialmente la memoria. Tampoco resulta difícil coincidir en que la memoria es una de las propiedades más destacada y apreciada de toda persona, y que tiene su asiento en el cerebro.

En la actualidad, la investigación que tiene por objeto a la memoria está conformada por un conglomerado de disciplinas tributarias de varias ciencias y se encuentra en permanente evolución.

En este trabajo de tesis se utilizaron diferentes modelos experimentales relacionados con la biología de la memoria y, en particular, estuvo enfocado a esclarecer la intervención del sistema colinérgico muscarínico, con la rata como unidad de experimentación.

Se desarrollaron experimentos en tres niveles de organización bien definidos y posiblemente relacionados: el más integrativo es el de la memoria definida operativamente en función de un paradigma comportamental (específicamente, la evitación inhibitoria), analizado, por supuesto, en el animal entero; en un nivel intermedio, que correspondería al funcionamiento de órganos y tejidos, elegimos un modelo de plasticidad sináptica, la potenciación de larga duración (LTP, de la expresión del inglés "*Long Term Potentiation*"), estudiada en rodajas de cerebro de rata; por último, a nivel celular y macromolecular, de transducción de señales, estudiamos el rol de los receptores muscarínicos en el control del mensajero intracelular AMP cíclico (AMPc).

A lo largo de esta tesis intentaremos relacionar los tres niveles de estudio y tomaremos a la LTP como eje central y puente hacia los otros dos niveles.

Teoría Sináptica de la Memoria

Es probable que el cerebro de los mamíferos sea el sistema con el mayor grado de complejidad del universo, complejidad emergente de su estructura y organización, que se verifica en su funcionamiento.

En lo que se refiere a los cambios comportamentales causados por la experiencia, que requieren de los procesos de aprendizaje y memoria, las primeras ideas formalizadas se remontan al siglo XIX. Básicamente, se especuló que los cambios comportamentales son producto de un aprendizaje que deja una traza de memoria, aunque sea muy breve; y comenzó a proponerse, hacia fines del siglo XIX y comienzos del XX, que ello se asentaría en un cambio en el número y/o eficacia de las sinapsis involucradas.

Entre los impulsores de las ideas preliminares de una teoría sináptica de la memoria podemos nombrar, entre los más prominentes, Ramón y Cajal (1909) y Tanzi (1893), Hebb (desarrollo de una teoría del reforzamiento —*strengthening*— sináptico para dar cuenta del aprendizaje, 1949), Konorski (define plasticidad: capacidad de las neuronas de ser alteradas por la experiencia, 1948,) y Eccles (desarrolla el concepto sobre las propiedades de las neuronas de la corteza cerebral, que les confieren la posibilidad de sufrir cambios plásticos, 1966).

En la actualidad, una vastísima cantidad de evidencia empírica avala el concepto de que la memoria involucra, a nivel celular, el cambio sináptico producido por la experiencia. Además, el desarrollo de los modelos de redes neuronales, junto con la gran capacidad de cómputo alcanzada en la actualidad, aportan sustento a dichas hipótesis e inspiración a la investigación en el campo de las neurociencias.

Anatomía de la memoria

Las primeras evidencias que sustentaron la hipótesis del vínculo entre la memoria y el hipocampo provinieron de algunos casos de la clínica médica cuando, con la intención de paliar las consecuencias de la epilepsia refractaria a tratamiento farmacológico, se practicaba la remoción del lóbulo temporal a fin de eliminar el foco epiléptico. Se pudo

observar que estos pacientes, luego de la cirugía, presentaban serios problemas de memoria (Scoville y Milner, 1957).

El lóbulo temporal medial es un sistema anatómico y funcional bien definido, incluye la formación hipocámpica (hipocampo, *subiculum* y fimbria-fornix), la corteza entorrinal y las cortezas adyacentes (perirrinal y parahipocámpica) (Amaral y Witter, 1995; Squire y Zola, 1996; Burwell y Amaral, 1998). La formación hipocámpica es uno de los componentes más importantes, dentro de las estructuras del lóbulo temporal medial involucrada en la formación de memorias.

La formación hipocámpica recibe distintas inervaciones aferentes subcorticales a través de la fimbria-fornix, desde el área ventral (dopaminérgica), el locus coeruleus (noradrenérgica), los núcleos del rafe (serotoninérgica) y el septum medial (colinérgica). Además, el hipocampo recibe información sensorial, propioceptiva y moduladora de distintas áreas del cerebro, y envía información hacia diferentes regiones del cerebro: está conectado con la amígdala y con otras áreas de la corteza, también implicadas en el procesamiento de la memoria.

El hipocampo de los roedores puede ser dividido en el giro dentado (DG), el área CA3 y el área CA1 (figura 1). Tiene una organización neuronal laminar formada por distintos subtipos celulares, siendo las neuronas piramidales las mayoritarias y las que forman gran parte de la capa llamada *stratum pyramidale* (Paxinos, 1995). Las neuronas piramidales cuentan con un árbol dendrítico apical y otro basal, que determinan dos regiones denominadas *stratum radiatum* y *stratum oriens*, respectivamente. Además existe, en el hipocampo, una gran variedad de neuronas no piramidales, gran parte de las cuales participa de la transmisión inhibitoria mediada por GABA, y son consideradas como parte de circuitos neuronales locales (Paxinos, 1995).

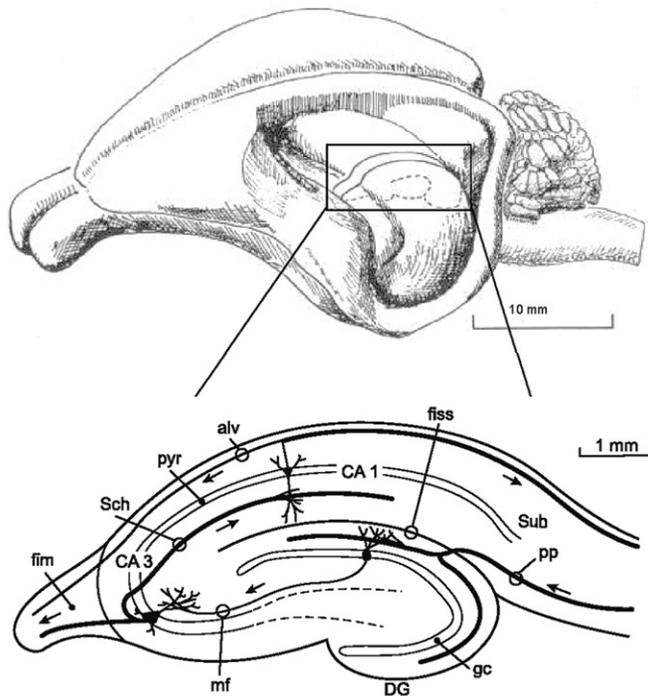


Figura 1 Principales vías de la formación hipocámpica. Corte sagital que muestra la vía perforante (pp), las células granulares (cg), las fibras musgosas (mf), la fimbria (fim), la vía colateral de Schaffer (Sch), las células piramidales (pyr), el subiculum (sub) y el alveus (alv). Las flechas marcan el sentido de la transmisión sináptica. (Tomado de Basic Neurochemistry, 7º ed., 2006)

La sinapsis que se establece entre las fibras del haz de Schaffer, provenientes de las neuronas piramidales de CA3, y las neuronas piramidales de CA1, es de tipo excitatorio; es decir que se libera glutamato desde el terminal axónico y la unión del neurotransmisor a los receptores de la postsinapsis produce corrientes iónicas que despolarizan la membrana postináptica, aumentando la probabilidad de que la neurona postsináptica dispare un potencial de acción.

El aminoácido glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en los mamíferos; hay una gran variedad de receptores para este ligando en las neuronas del SNC, todos formados por proteínas intrínsecas de membrana.

Existen cinco subtipos de receptores metabotópicos mGLU (que al unirse al neurotransmisor interactúan con proteínas G) y tres clases de receptores ionotrópicos (es decir que, además de un sitio de unión para el neurotransmisor, estos receptores son canales iónicos cuya apertura es regulada por el ligando): receptores AMPA (*Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid*), Kainato y NMDA (*N-methyl-D-aspartate*). Los receptores NMDA tienen la particularidad única de ser regulados por el ligando, pero también la apertura de su canal es regulado por el potencial de membrana.

Reseña histórica de la LTP

Guiada por la hipótesis de que la memoria debería tener un correlato en cambios en la eficiencia de la transmisión sináptica (Hebb, 1949), la investigación en neurobiología de las décadas de 1960/70, intentaba encontrar la forma de producir artificialmente tales cambios sinápticos en el sistema nervioso central. En 1973, una publicación de Bliss y Lomo anuncia el hallazgo del fenómeno de potenciación sináptica duradera promovida por un breve, aunque intenso, período de actividad sináptica, producido por estimulación eléctrica en la región CA3 del hipocampo de conejo anestesiado (Bliss y Lomo, 1973).

A partir de entonces, la LTP se ha convertido, por varias razones, en un paradigma experimental ampliamente estudiado.

Dos temas han dominado la investigación en este campo: la primera pregunta clave es si los mecanismos neuronales de la LTP son los mismos que, o al menos comparten algo con, aquellos responsables de la memoria y el aprendizaje en un organismo. En otras palabras ¿es la LTP un modelo neuronal de la memoria?

La segunda pregunta, de alguna manera independiente de la primera y no menos importante, apunta a si es posible entender mejor el funcionamiento de las neuronas a partir de estudiar cómo cambia su fuerza de comunicación. Las principales características de la LTP, que la hacen un mecanismo extremadamente seductor para el estudio del funcionamiento del SNC, son su especificidad, la asociatividad y la metaplasticidad (Lisman, 2003; Lynch 2007).

Dada la estrecha vinculación del hipocampo con la memoria (Scoville y Milner, 1957; Squire y Zola, 1996), no es llamativo que la era de la LTP se iniciara en esta estructura, particularmente en la vía de las colaterales de Schaffer y luego en el giro dentado, sobre cuyas neuronas contactan las fibras que llegan de la corteza entorrinal, a través de la vía perforante. Posteriormente, se han ido describiendo fenómenos de LTP en varias otras sinapsis del hipocampo, por ejemplo en la región del giro dentado, en CA3 y en CA1, y en muchas otras estructuras del cerebro, como amígdala, estriado y corteza cerebral, que comparten características generales además de poseer algunas distintivas propias.

En adelante, al referirnos a LTP, a menos que se aclare lo contrario, tendremos en cuenta a las que se producen en las sinapsis glutamatérgicas que establecen las fibras

colaterales de Schaffer, axones originados de las neuronas de CA3, con las células piramidales de CA1.

Maquinaria bioquímica de la LTP

Concisamente: la LTP es un fenómeno experimental de plasticidad sináptica por el cual, en respuesta a determinados estímulos, la transmisión sináptica resulta aumentada y dicho aumento persiste por varias horas *in vitro*, e incluso puede perdurar por días *in vivo*. La forma más común de producir LTP consiste en proporcionar estimulación eléctrica presináptica de alta frecuencia por breves períodos de tiempo.

Se han distinguido diferentes etapas de este fenómeno: la fase de inducción, durante la cual se suministra el estímulo adecuado para obtener la potenciación (generalmente no más de 2 minutos); la fase de expresión, inmediata a la inducción, cuando se produce el aumento de la transmisión y, sin que sea posible distinguir netamente el inicio, la fase de establecimiento (que puede durar de horas hasta incluso días), que parece depender de la síntesis proteica, aunque no se han establecido concretamente cuáles proteínas serían necesarias (Lynch y col., 2007).

Más adelante presentaremos algo sobre los diferentes protocolos empleados para la inducción del LTP. Nos dedicaremos ahora a detallar, lo más brevemente posible, los acontecimientos moleculares desencadenados por la inducción y sus consecuencias sobre la comunicación neuronal.

Dado que en toda sinapsis hay un componente presináptico y otro postsináptico, en principio podría asumirse que los cambios que se producen al inducir LTP posiblemente afecten a ambas estructuras. Sin embargo, este es un tópico sin resolver y sobre el que aún se debate arduamente: no hay dudas de que ocurren grandes cambios en la membrana postsináptica, de los cuales la incorporación de más receptores de glutamato de tipo AMPA es el más importante (Malinow, 2003), pero no queda claro si la LTP altera también la presinapsis: los principales candidatos son un aumento en la probabilidad de liberación de las vesículas con neurotransmisor y un aumento del *quantum*, o contenido de neurotransmisor por vesícula).

A los receptores glutamatérgicos NMDA se les atribuye un rol clave en la LTP, en la espina dendrítica; debido a sus propiedades biofísicas, estos receptores que, en condiciones basales se encuentran bloqueados por Mg^{2+} extracelular, se desbloquean cuando la membrana se despolariza; esto ocurre, por ejemplo, cuando se sostiene una alta frecuencia de estimulación del terminal sináptico. La activación de los NMDA implica la apertura del canal catiónico incorporado en la molécula, y el ingreso de Ca^{2+} al interior celular. Este mensajero intracelular activa varias proteína-quinasa; entre ellas, las más relevantes son CaMK II (proteína quinasa dependiente de Calcio-Calmodulina) y PKC (proteína quinasa dependiente de Ca^{2+}) (Ling y col., 2002; Lisman y col., 1997; Malenka y col., 1986; Malinow y col., 1989); como consecuencia, se producen sucesivas fosforilaciones, debido a lo cual se incorporan más receptores AMPA en la membrana de la espina dendrítica. Al aumentar la concentración de dichos receptores en este compartimiento, la misma cantidad de neurotransmisor que antes provocaba la respuesta basal, ahora produciría una respuesta aumentada.

El Ca^{2+} no es el único segundo mensajero que interviene en la LTP; el AMPc es otro mensajero intracelular que aparece relacionado con los procesos bioquímicos que se desencadenan durante la inducción y el establecimiento de la potenciación. Uno de los más importantes blancos del AMPc es la proteína quinasa A (PKA), cuya activación es uno de los requisitos necesarios para el aumento de la eficiencia sináptica que es consecuencia de la LTP de CA1 (Esteban y col., 2003).

Sin embargo, aún no se han identificado con claridad las cascadas de señalización esenciales en la potenciación y tampoco las posibilidades de entrecruzamiento (*cross-talk*) de las diferentes vías.

El aumento de los niveles intracelulares de AMPc es, por sí mismo, capaz de incrementar la eficacia sináptica: se ha mostrado que la activación de la adenilato ciclasa (por forskolina) o la inactivación de las fosfodiesterasas (por IBMX), conllevan a una potenciación de la transmisión sináptica excitatoria en CA1 (Chávez-Noriega y Stevens, 1994, 1992).

Con el agregado de alguna manipulación farmacológica, como la disminución de la concentración de Mg^{2+} , y agregando picrotoxina (bloqueante de los canales GABA), que suprime la transmisión inhibitoria, es posible hacer que la potenciación provocada por el aumento de AMPc se haga perdurable más allá del tratamiento, resultando en lo que se ha denominado *chemical* LTP (Otmakhov y col., 2004).

Surge de estos datos la idea de que en la LTP intervienen varias vías de señalización intracelular, algunas de las cuales deben ser activadas como condición *sine qua non* para la producción de LTP, en tanto que otras serían simplemente modulatorias, y podrían ser activadas diferencialmente en función de la estimulación empleada durante la inducción.

Otro aspecto de la LTP que genera controversias es la necesidad de síntesis proteica *de novo*, y si ésta ocurre en el soma de la neurona o si puede realizarse, de forma específica, en la propia espina dendrítica que estaría siendo potenciada (Frey y Morris, 1997; Martin y col., 1997). Es posible que las cascadas de señalización intracelular que se activan por la inducción de LTP repercutan, en última instancia, sobre el núcleo de la neurona, reclutando la expresión genética necesaria para sostener la potenciación sináptica (Huang y col., 1998; Silva y col., 1998; Frey y col., 1988). Sin embargo, esto aún no ha sido demostrado inequívocamente.

Se ha hecho cada vez más consistente la idea de que la LTP es un fenómeno sumamente complejo: intervienen una variedad impresionante de proteínas, que interactúan entre sí de múltiples maneras y que, además, migran selectivamente a través de los diferentes compartimientos neuronales, incluso a escala de microdominios.

Si bien, tal como lo acabamos de describir, la LTP es un fenómeno esencialmente glutamatérgico, otros neurotransmisores pueden modularlo, tanto positiva como negativamente, porque sus vías de transducción de señales y las cascadas enzimáticas que ellas activan se solapan, aunque sea parcialmente, con las que intervienen cuando se activa el receptor NMDA.

Además, distintos sistemas de neurotransmisores pueden intervenir directa o indirectamente mediante circuitos neuronales alternativos al de la vía de las colaterales de Schaffer/neuronas piramidales de CA1, inhibiendo o favoreciendo el establecimiento de la potenciación.

Nuestras investigaciones intentan esclarecer el o los efectos de la participación muscarínica en este modelo de plasticidad sináptica, principalmente en lo que respecta al subtipo de receptores M4. Estos receptores muscarínicos (RACHM) para los que no hay publicado ningún dato en general, ni tampoco hay datos provenientes de experimentación con animales KO, por ejemplo, de acuerdo a los estudios con ligandos

clásicos (de dudosa selectividad por subtipos), no tendrían un papel relevante en LTP (Auerbach y Segal, 1996).

El origen de nuestra inquietud reside en que nosotros hemos visto que el bloqueo de los receptores M4 durante la consolidación produjo amnesia (Sánchez, 2002 Tesis de Licenciatura, ver más abajo), por lo tanto la activación de estos receptores es uno de los requisitos para la formación de una traza de memoria y, en consecuencia, posiblemente también intervendrían en los procesos de plasticidad sináptica que se supone son el soporte biológico de la memoria.

Por otro lado, también nos pareció interesante probar si la activación del subtipo M4 es necesaria en el proceso de evocación, ya que se supone que, por lo menos parcialmente, la consolidación y la evocación comparten mecanismos moleculares y circuitos neuronales.

Breve historia del descubrimiento de la ACh

La acetilcolina (ACh) fue el primer compuesto en ser identificado como neurotransmisor, y fue propuesta como mediador químico de sinapsis del sistema nervioso periférico y luego del central (SNC). Filogenéticamente, esta molécula se encuentra a lo largo de todo el reino animal e incluso en algunas plantas, donde cumple funciones de defensa (ver Venter y col., 1988).

La ACh consiste en colina (una sustancia presente en los alimentos, que es asimilada por las células colinérgicas mediante un sistema de recaptación de alta afinidad, dependiente de sodio, y mediante un *up-take* de baja afinidad, menos relevante) y un grupo acetilo provisto por acetil-Coenzima A (producida intracelularmente por el metabolismo oxidativo en la mitocondria). La síntesis de la ACh ocurre en los terminales axónicos y es catalizada por la enzima Colina-Acetiltransferasa (ChAT, el más confiable marcador de neuronas colinérgicas) (Basic Neurochemistry, 7th edition, 2006).

La prueba experimental del rol de mediador químico de la ACh fue dada por los experimentos de Löewi (Löewi, 1921; Löewi y Navratil, 1926). Recién en 1953 se describieron los sitios de liberación de ACh en SNC (MacIntosh y Oborin, 1953).

El sistema colinérgico ha sido objeto de interés para el estudio del funcionamiento del SNC: ya era conocido el efecto de los anticolinérgicos en aprendizaje y memoria (Bartus y col., 1985; Introini-Collison y Baratti, 1992; Karczmar, 1995), y también se postuló tempranamente la disfunción colinérgica como un evento determinante en la enfermedad de Alzheimer (Selkoe y Kosik, 1983).

Breve historia de los RACHM

El descubrimiento de la muscarina y sus sitios de unión, los RACHM, tuvo su origen en el estudio de los efectos fisiológicos de un hongo, *Amanita muscaria* (el interés original en este hongo consistía en sus efectos psicofarmacológicos; aunque parece dudoso que la muscarina contribuyera realmente a los efectos alucinógenos de los extractos del hongo, muy probablemente otros alcaloides, como el ácido iboténico, tengan que ver con tales efectos). Schmiedeberg y Koppe (1869) describieron que extractos del hongo podían enlentecer y, a concentraciones más altas incluso detener, el latido del corazón de rana. Ellos purificaron el extracto y le dieron el nombre de muscarina.

En 1914, Henry Dale describe el efecto de la nicotina (derivado de la planta del tabaco *Nicotiniana tabacum*) y lo distingue del de la muscarina: la primera era antagonizada por curare y la segunda, por atropina. La idea de la existencia de receptores para la ACh quedó finalmente establecida por Eccles (1953).

Los nicotínicos son receptores ionotrópicos, la unión de la acetilcolina provoca la apertura del canal y el ingreso de cationes (Na^+ principalmente). Su activación está ligada a cambios rápidos y de corta duración (fásicos).

Por el contrario, los muscarínicos son receptores metabotrópicos, su activación involucra una sucesión de interacciones entre proteínas y reacciones enzimáticas, lo que determina que las respuestas que desencadenan sean más lentas y prolongadas (tónicas).

Los caminos de la LTP

Hemos mencionado más arriba que es común el empleo de diferentes protocolos de inducción para provocar LTP; a continuación veremos algunos de ellos, los más comunes.

Históricamente, la primera estimulación para generar LTP consistió en un estímulo eléctrico de tipo tetánico, compuesto de uno a varios trenes de algunos segundos de duración, de estimulación a alta frecuencia (*high frequency stimulation*, HFS: 100 Hz usualmente).

Otra forma es el estímulo tipo teta (*theta burst stimulus*, TBS) que, de forma similar a la anterior, implica una intensa actividad durante algunos segundos. El TBS se introdujo inspirado en patrones de disparo naturales del hipocampo (Larson y Lynch, 1986).

El mayor problema para estos dos tipos de inducción, cuando se postula a la LTP como el sustrato biológico de la memoria es la improbable, prácticamente imposible, relevancia de este tipo de estimulación en un contexto fisiológico.

Con la idea de esclarecer las propiedades Hebbianas del funcionamiento sináptico, aparecieron trabajos en los que se aparee la despolarización, mediante la técnica de fijación de voltaje, con la activación sináptica de baja frecuencia (Kelso y col., 1986; Wigström y col., 1986). Así se consigue liberar el ion Mg^{2+} que bloquea el receptor NMDA y se posibilita el ingreso de Ca^{2+} por el canal, una vez que se une el glutamato que se libera desde el terminal axónico a la hendidura sináptica.

También queremos señalar acá que se han aprovechado los ritmos oscilatorios del hipocampo para inducir LTP con únicamente 4 choques, dándole una base fisiológica mucho más sólida a la posibilidad de que la LTP sea efectivamente el mecanismo biológico de la memoria, al menos a nivel sináptico (Bliss y col., 2003).

La gran variedad de métodos para la inducción de LTP se ve reflejada en la diversidad de expresión de la potenciación: hay variaciones en la magnitud y en el curso temporal de la potenciación; es fácil encontrar en la literatura formas diferentes de LTP (Lynch y col., 2007).

Resulta interesante mencionar en este punto que, debido a las diferencias de intensidad, frecuencia y duración en la estimulación para inducir LTP, es posible que se estén activando diferentes mecanismos celulares en cada caso.

En estudios que analizan el efecto de la concentración de diferentes *buffers* sobre la inducción de LTP, se demuestra que para algunos tipos de protocolos, el Ca^{2+} actúa a nivel del dominio local, mientras que otros protocolos son diferencialmente sensibles a los *buffers* de Ca^{2+} (Hoffman y col., 2002). Esto sustenta la idea de la existencia de múltiples sensores de Ca^{2+} , cada uno acoplado a diferentes mecanismos de potenciación.

El sensor primario de Ca^{2+} para la LTP es la enzima CaMKII, lo que fue probado ampliamente (Otmakhov y col., 1997; Lledo y col., 1995; Fukunaga y col., 1993).

Otro transductor de señales implicado en LTP es la Adenilato-Ciclasa activada por Ca/calmodulina (Chetkovich y Sweatt, 1993; Wong y col., 1999). Aparentemente, la vía del AMPc no desencadenaría directamente la potenciación, pero es capaz de estimular la actividad neuronal que dispara la LTP por el proceso habitual, dependiente del receptor NMDA (Bozdagi y col., 2000; Makhinson y col., 1999).

RAChM & LTP

En el caso del sistema colinérgico y su participación en la LTP en CA1, nos interesa comentar dos tipos de evidencias sobre su rol al respecto: por un lado, los efectos que agonistas y antagonistas específicos por RAChM, aunque no selectivos por subtipos de receptores, tienen sobre la LTP y, por otro lado, la información proveniente de experimentación con animales en los que se ha bloqueado genéticamente la expresión de alguno de los subtipos de RAChM. Debido a la pobre selectividad de la mayoría de los agentes farmacológicos utilizados, y al carácter contradictorio de la evidencia experimental al respecto, nos parecen provisorias las conclusiones que puedan extraerse de esos trabajos, en lo que respecta al rol específico de los diferentes subtipos de RAChM.

Ha sido descrito que la aplicación del agonista carbacol, en bajas concentraciones y con estimulación eléctrica de baja frecuencia (0.033 Hz), induce LTP; incluso, concentraciones menores de este agonista muscarínico, que no provocan efectos detectables por sí mismas, disminuyen el umbral para la inducción tetánica de la LTP, según los trabajos de Auerbach y Segal (1994). Estos autores denominaron “LTP

muscarínica” (LTPm) a ese fenómeno y, posteriormente, identificaron la acción del carbacol en la postsinapsis, atribuyendo tal potenciación a la activación del receptor M2 (Auerbach y Segal, 1996).

En un estudio más reciente, se evaluó el rol de los RACHM en la LTP *in vivo* y se sugirió que el receptor M2 sería el responsable la potenciación de la transmisión glutamatérgica de CA1, actuando en la presinapsis (Li y col., 2007).

En cuanto a la experimentación con animales *knock-out* para diferentes subtipos de RACHM, se han producido cepas con supresión de la expresión de cada uno de los subtipos de receptores, e incluso, hay algunos animales con doble *knock-out*. Los autores afirman que en ninguno de los casos se detectaron anomalías morfológicas o funcionales y que tampoco se pudo detectar compensación de la falta del subtipo eliminado por sobre-expresión de alguno de los demás (Seeger y col., 2004).

En el ratón KO para M1 se observó una LTP normal al inducir mediante HFS y una LTP apenas reducida al inducir por TBS (Anagnostaras y col., 2003). En una publicación independiente, se observó LTP intacta en el KO de M1 y también en el de M3, induciendo por HFS (Shinoe y col., 2005). Por otro lado, en el KO de M2 se produjo una LTP severamente reducida al inducir mediante TBS (Seeger y col., 2004).

En algunos de estos trabajos también se probó el desempeño de los ratones KO en varios paradigmas comportamentales, y sólo se vio afectada la memoria en determinados aprendizajes.

No hay, hasta la fecha, ningún artículo que refiera experimentos de plasticidad sináptica o comportamiento con animales KO para M4.

RACHM & Excitabilidad de las Neuronas Piramidales de CA1

La activación de los RACHM modula la excitabilidad neuronal de forma dual: a diferentes concentraciones de agonistas puede haber tanto un aumento como una disminución de la actividad eléctrica. También se describieron algunos efectos de los RACHM sobre diferentes conductancias. Y debido a la falta de agentes suficientemente selectivos, no ha podido aún esclarecerse el rol de cada subtipo de receptor en estos efectos.

Bajas concentraciones del agonista carbacol (0.5 μ M) incrementan el fEPSP evocado, y si la exposición a la droga se extiende por 20 minutos, se obtiene LTPm (Auerbach y Segal, 1996).

Concentraciones más elevadas de carbacol (5 μ M) producen una inhibición de la transmisión, que es removida por lavado de la droga (Auerbach y Segal, 1996).

También ha sido demostrada la capacidad de los RACHM para modular, positiva o negativamente, distintas corrientes iónicas en las neuronas piramidales de CA1. Entre ellas, corrientes de K^+ (Bernardo y Prince, 1982; Brown y Adams, 1980), y corrientes mediadas por receptores AMPA y NMDA (Marino y col., 1998; Auerbach y Segal, 1996; Markram y Segal, 1990).

La identificación de los subtipos de RACHM que intervienen específicamente en cada caso es sumamente dudosa, pero de todas formas la multiplicidad de los efectos sugiere un cuadro complejo en el que los diferentes RACHM podrían tener roles bien diferenciados e incluso opuestos entre sí.

Actividad neuronal sincronizada

Ritmos en hipocampo y su relación con memoria y plasticidad sináptica

Las oscilaciones rítmicas en la actividad eléctrica de una estructura nerviosa o de alguna parte de ella, son el resultado de la actividad eléctrica sincronizada de poblaciones neuronales, y han sido vinculadas tanto con los fenómenos de plasticidad sináptica, como con actividades comportamentales estrechamente relacionadas con aprendizaje y memoria. Y es justamente debido a esto último que nos interesa introducir las en el marco conceptual de este trabajo de tesis, en un intento por relacionar tres niveles de análisis diferentes: el modelo de plasticidad sináptica canónico (LTP), la actividad neuronal concertada de hipocampo (las oscilaciones rítmicas) y el aprendizaje y la memoria (definidos en función de un paradigma comportamental).

LTP y LTD son formas de plasticidad sináptica dependientes de actividad, postuladas como sustratos de la formación de memorias. El consenso establecido indica que estos procesos son causados por patrones de estimulación de frecuencias muy diferentes (Artola y Singer, 1993; Linden, 1994; Teyler y col., 1994). Típicamente, la LTP es inducida por estimulación durante 1 segundo a alta frecuencia (100 Hz) (Bliss y Lomo,

1973; Bliss y Collingridge, 1993), mientras que la LTD se obtiene por estimulación durante 7 a 15 minutos, a baja frecuencia (1-3 Hz) (Dudek y Bear, 1992; Mulkey y Malenka, 1992). Uno de los mayores desafíos afrontados al postular estos fenómenos como sustratos celulares de la memoria, es que tales patrones de estimulación (tanto en la frecuencia, como en lo que respecta a su duración temporal) parecen no ocurrir, o simplemente ser muy improbables, en condiciones fisiológicas. Es posible que sean requeridos estos patrones de estimulación *in vitro*, debido a la pérdida de las entradas modulatorias en la preparación de rodajas de hipocampo. Es interesante notar que la parte del sistema colinérgico con origen en el septum medial y en la banda diagonal de Broca, que inerva por completo a la formación hipocampal, modularía la plasticidad sináptica (Huerta y Lisman, 1995, 1993; Auerbach y Segal, 1994).

También se ha mostrado que el agonista carbacol es capaz de inducir oscilaciones de mayor frecuencia en el rango de frecuencia beta (13-20 Hz), y que esta actividad es dependiente de los receptores M1, M3 y M4 y no del M2 (Arai y Natsume, 2006).

Receptores Muscarínicos

Las primeras clasificaciones de los RACHM en subtipos se basaron en datos farmacológicos (básicamente, de acuerdo a la sensibilidad por el antagonista escopolamina). En 1987 se comenzaron a clonar los diferentes subtipos (Bonner y col., 1987, 1988) y se ha venido tratando de establecer la correspondencia entre la evidencia farmacológica y la molecular desde entonces.

Los RACHM son codificados por cinco genes diferentes y pertenecen a la superfamilia de receptores de siete segmentos de transmembrana, que se acoplan a proteínas de membrana que unen GTP (proteínas G).

Por efecto de la unión del neurotransmisor, los receptores M1, M3 y M5 preferentemente estimulan la degradación del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol: el complejo ligando-receptor activa la proteína G_q y ésta, a la fosfolipasa C, que genera DAG (diacilglicerol) e IP3 (inositol tri-fosfato) a partir del fosfatidilinositol (Peralta y col., 1988).

La activación de los receptores M2 y M4 conduce preferentemente a la inhibición de la actividad de la enzima adenilato ciclasa, por vía de la proteína G_i , y a una disminución

consecuente de la concentración citoplasmática del segundo mensajero AMPc (Peralta y col., 1988).

El acoplamiento de los RACHM a las respectivas proteínas G es de tipo preferencial, con lo cual la efectiva interacción quedaría determinada, entre otros factores, por la concentración y localización de ambas familias de proteínas, las de los RACHM y las de las proteínas G. Además, también existe la posibilidad de que se establezcan interacciones, mediadas posiblemente por otras proteínas G, con otros sistemas, como la modulación directa de conductancias iónicas a través de actuar sobre canales iónicos, por ejemplo de K^+ , a través de proteínas G_K (Higashida y col., 1990; Hulme y col., 1990; Fukuda y col., 1988; Jones y col., 1988).

Adenilato Ciclasa

Existen descritas diez isoformas, nueve unidas a membrana y una soluble únicamente detectada en el testículo (citas); constituyen la familia de proteínas con actividad de Adenilato Ciclasa (AC), enzima que cataliza la conversión del nucleótido adenosina trifosfato (ATP) en adenosina mono-fosfato cíclico (AMPc), mensajero intracelular.

Cada subtipo de AC está codificado por genes distintos y tiene un patrón de expresión específico en el cerebro (ver Chern 2000).

Las actividades de las diferentes isoformas presentan susceptibilidades de modulación particulares. Entre los moduladores se incluyen: proteínas G, calmodulina, Ca^{2+} , Calcio-calmodulina quinasas II y IV (CaMK), calcineurina, proteína quinasa A (PKA), algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC), y la droga forskolina (FSK) (ver Chern, 2000). En base a la homología de secuencia y a la modulación de su actividad, las nueve isoformas asociadas a membrana se clasifican en cuatro grupos:

- 1) isoformas ACI ACIII y ACVIII, se estimulan por Ca^{2+} y por CaMK;
- 2) ACII, IV y VII, son insensibles al Ca^{2+} y estimulables por $G_{\beta\gamma}$;
- 3) ACV y VI, inhibidas por Ca^{2+} y $G_{i\alpha}$;
- 4) ACIX, la única que no es activada por FSK, pero es sensible a calcineurina.

La isoforma ACV se expresa predominantemente en estriado, en neuronas de tamaño mediano que expresan también los receptores dopaminérgicos D1 (Mons y Cooper,

1994) y su actividad es inhibida por Ca^{2+} y PKA y estimulada por PKC (Iwami y col., 1995; Kawabe y col., 1994; Ishikawa y col., 1992).

La expresión de variantes de AC es bastante más compleja en hipocampo, resulta interesante que la ausencia de dos isoformas (ACI y ACVIII), estimuladas por Ca^{2+} /calmodulina, impide la LTP, mientras que la falta de sólo una de ellas no (Wong y col., 1999). De todas las isoformas expresadas en hipocampo, las variantes más conspicuas en CA1 son ACII y ACIX (Visel y col., 2006). Otro aspecto relevante de las enzimas AC es su actividad basal y su sensibilidad a la activación por forskolina: ambas características varían notablemente entre las diferentes AC (ver Hanoune y col., 1997).

Toxinas muscarínicas

Los venenos de las serpientes mamba (género *Dendroaspis*) contienen varias neurotoxinas proteicas con considerables diferencias, en términos farmacológicos, respecto de las toxinas que se encuentran en los venenos de serpientes filogenéticamente relacionadas.

Además de las α -neurotoxinas, típicas de la familia *Elapidae* (curaremiméticas: se unen a los receptores nicotínicos) (Rees y Bilwes, 1993), los venenos de mambas contienen toxinas poco comunes, como las dendrotoxinas (bloqueantes de ciertos canales de K^+) (Harvey y Anderson, 1991; Harvey, 1990), las fasciculinas (inhibidores de la acetilcolinesterasa) (Cerveñansky y col., 1991), las calciceptinas (bloqueantes de canales de Ca^{2+}) (De Weille y col., 1991) y las toxinas muscarínicas (MTs) que se unen, algunas con enorme selectividad, a los RACHM.

Las primeras en ser aisladas fueron las toxinas MT1 y MT2 (Adem y col., 1988; Jerusalinsky y col., 1992); luego siguieron apareciendo reportes sobre nuevos péptidos, de pesos moleculares cercanos a los 7 kDalton, con atributos muscarínicos varios de ellos: MT1, MT2 y MT3 (Liang y col., 1996; Kornisiuk y col., 1995; Jerusalinsky y col., 1993; Max y col., 1993; Ducancel y col., 1991; Karlsson y col., 1991), MT4 (Vandermeers y col., 1995); MT7 (Jolkkonen, 1996). Todas comparten una alta homología de secuencias y con sus ocho residuos de cisteína en posiciones muy similares, lo que implica un patrón de puentes disulfuro y una estructura terciaria similares. Ségalas y colaboradores (1995) determinaron la estructura tridimensional de

MT2: pertenece al grupo de toxinas en conformación de tres dedos, ricos en estructura secundaria de hoja β -plegada, unidos a un centro globular por puentes disulfuro.

En nuestro laboratorio se comenzó a trabajar con las MTs hace más de quince años. Los primeros estudios consistieron en el aislamiento y purificación, y en la determinación de selectividades.

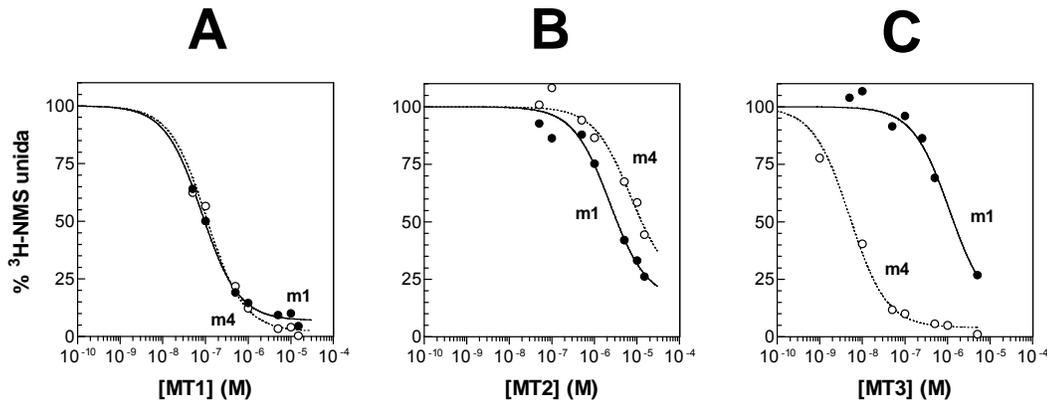


Figura 2 Selectividad de las toxinas muscarínicas por subtipos de RACHM. Curvas de inhibición de la fijación específica del radioligando $^3\text{H-NMS}$ por las toxinas MT1 (A), MT2 (B) y MT3 (C) en membranas conteniendo los subtipos puros de los receptores clonados humanos m1 (círculos negros) y m4 (círculos blancos). Los valores de K_i para m1 y m4, respectivamente: MT1 11 nM y 10 nM; MT2 211 nM y 1.97 μM ; MT3 250 nM y 1.17 nM. Las afinidades para los demás subtipos resultaron mucho menores (Kornisiuk 1998 Tesis Doctoral; Jerusalinsky y col., 1998).

La figura 2 ilustra los resultados de experimentos de inhibición de la fijación específica del radioligando $^3\text{H-N-metil-escopolamina}$ en membranas que expresan separadamente los receptores clonados M1 y M4. Se aprecia con claridad cómo MT1, a bajas concentraciones, consigue desplazar la marca de ambos receptores, MT2 lo hace con una afinidad un poco menor, pero con cierta discriminación en favor de M1 respecto de M4, mientras que MT3 muestra una contundente selectividad por M4, con una afinidad que supera en 214 veces la afinidad por el subtipo M1 (Kornisiuk y col., 1995; Jerusalinsky y col., 1998). La unión de estas toxinas con los restantes subtipos de RACHM, comparados con M1 y M4, es prácticamente despreciable.

Más recientemente, hemos empezado a determinar el perfil farmacológico de las tres toxinas (MT1, MT2 y MT3) (Sánchez, 2002, Tesis de Licenciatura) y se han publicado artículos en los que se emplean las toxinas para estudios de distribución de los RACHM en cerebro (Jerusalinsky y col., 2000; Jerusalinsky y col., 1998; Adem y col., 1995;

Jerusalinsky y Harvey, 1994) y en experimentos de comportamiento, para evaluar su efecto sobre la consolidación de memorias (Ferreira y col., 2003; Sánchez, 2002, Tesis de Licenciatura; Jerusalinsky y col., 1998, 1995, 1993).

Se hicieron ensayos de autoradiografías en cortes de cerebro de rata en los que se inhibió la unión de escopolamina tritiada con concentraciones crecientes de las toxinas MT2 y MT3.

En la tabla 2 se muestran las estimaciones de las concentraciones de los diferentes RACHM en algunas regiones del cerebro.

	Corteza	Estriado	Giro Dentado	CA1	CA3
MT2	43.6	24.8	76	52.8	48
MT3	69	89	89	69	65

Tabla 2 Valores porcentuales de máxima inhibición de la unión de ³H-NMS en cortes de cerebro de rata por MT2 y MT3. La selectividad de las MTs permitió estimar las concentraciones de los RACHM M1 y M4 en diferentes regiones del cerebro: la estructura con más sitios putativos M1 y M4 resulto el giro dentado; en estriado habría una amplia predominancia de receptores M4 aunque los M1 también serían abundantes; en las demás regiones analizadas ambos subtipos se encontrarían bien representados. Jerusalinsky y col., 2000.

Objetivos generales

El objetivo general que nos planteamos al emprender este trabajo de investigación apuntó a evaluar el rol de los RACHM en procesos relacionados con las funciones cognitivas, en particular en lo que respecta al subtipo M4.

Con esta idea nos interesó estudiar la distribución de subtipos de RACHM en diferentes regiones del sistema nervioso central, especialmente aquellas relacionadas inequívocamente con la formación de memorias.

Por otro lado, nos pareció relevante analizar la intervención de los RACHM en los mecanismos de transducción de señales, enfocando nuestro trabajo en el mensajero intracelular AMPc.

Otro aspecto que quisimos abordar fue la plasticidad sináptica y su relación con la transmisión muscarínica.

Por último, quisimos evaluar la participación de los RACHM en un paradigma de aprendizaje y memoria, ampliamente establecido para ratas.

La mayor dificultad que se afronta al plantearse este tipo de estudios, es la falta de ligandos lo suficientemente selectivos como para realizar experimentos concluyentes.

Receptores Colinérgicos Muscarínicos y Ligandos con Selectividad

Subtipo	M1	M2	M3	M4	M5
Mecanismo de transducción	G _{q/11} (↑ IP ₃ DAG); NO	G _{i/o} (↓ AMPc / ↑ K ⁺)	G _{q/11} (↑ IP ₃ DAG); NO	G _{i/o} (↓ AMPc / ↑ K ⁺)	G _{q/11} (↑ IP ₃ DAG); NO
Antagonistas parcial/totalmente selectivos	MT7 (9.8) 4-DAMP (8.6-9.2) Triptiramina (8.4-8.8) Pirenzepina (7.8-8.5) AF-DX 384 (7.3-7.5) MT3 (7.1) Himbacina (7.0-7.2)	Triptiramina (9.4-9.6) AF-DX 384 (8.2-9.0) Himbacina (8.0-8.3) 4-DAMP (7.8-8.4) Pirenzepina (6.3-6.7) MT7 (< 6) MT3 (< 6)	4-DAMP (8.9-9.3) AF-DX 384 (7.2-7.8) Triptiramina (7.1-7.4) Himbacina (6.9-7.4) Pirenzepina (6.7-7.1) MT7 (< 6) MT3 (< 6)	MT3 (8.7) 4-DAMP (8.4-9.4) Himbacina (8.0-8.8) AF-DX 384 (8.0-8.7) Triptiramina (7.8-8.2) Pirenzepina (7.1-8.1) MT7 (< 6)	4-DAMP (8.9-9.0) Triptiramina (7.3-7.5) Pirenzepina (6.2-7.1) AF-DX 384 (6.3) Himbacina (6.1-6.3) MT7 (< 6) MT3 (< 6)

Tabla 1 Subtipos de RACHM y sus respectivos ligandos de mayor selectividad. Lista de los antagonistas muscarínicos con mayor capacidad de discriminación entre subtipos de RACHM, entre paréntesis figuran las afinidades correspondientes a cada ligando como pK_d.

Adaptado de 1999 *TiPS Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement (Tenth edition)*

Materiales y métodos

Animales

Se emplearon ratas macho Wistar de bioterio propio, provenientes originariamente de la cepa establecida en el bioterio central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, con un peso corporal de 220 ± 30 gramos y una edad de entre 75 y 95 días. Hasta el momento de ser sacrificadas, las ratas permanecieron agrupadas de a cuatro o cinco por jaula, con libre disponibilidad de agua y alimento, y un ritmo invertido de luz-oscuridad de 12:12 horas.

Para los cultivos organotípicos de hipocampo, se emplearon ratas de día postnatal 6 - 7

Bioquímica

Aislamiento de amígdala hipocampo y estriado

Los animales se sacrificaron por decapitación; se enfrió la cabeza por inmersión en hielo y se extrajo el cerebro abriendo la calota. Después de lavar el cerebro por inmersión en solución de sacarosa 0.32 M a 4°C, se disecaron las estructuras de interés para homogeneizarlas inmediatamente en 10 volúmenes de sacarosa 0.32 M, en un homogenizador con *potter* de vidrio y vástago de teflón.

Para extraer la amígdala se colocó el cerebro en una matriz de acrílico para hacer cortes frontales. El primer corte se realizó a la altura del quiasma óptico (-1.6 mm antero posterior (AP) desde Bregma), y el segundo, tres milímetros más atrás (-4.6 mm AP desde Bregma) (Atlas de Paxinos y Watson, 1995). Los núcleos amigdalinos fueron separados de esta rebanada de cerebro.

Preparación de membranas sinaptosomales para ensayos de unión específica de radioligandos

En el caso de las membranas destinadas a los ensayos de fijación específica, se centrifugó el homogenato a 1000 x g durante 10 min a 4°C; se descartó el *pellet*, y el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 11000 x g durante 20 min a 4°C. El *pellet* resultante se resuspendió en *buffer* hiposmótico de composición PO_4^{-3} , Na^+ , K^+ 25 mM (*buffer* de incubación diluido) durante 20 min a 4°C, este *shock* hiposmótico se hizo con el fin obtener "vesículas vacías o fantasmas" de membranas sinaptosomales. Luego se centrifugó a 100000 x g, durante 45 min a 4°C, y se resuspendieron las membranas sinaptosomales en *buffer* PO_4^{-3} , Na^+ , K^+ 50 mM, pH 7.4.

Fijación específica de radioligandos en membranas sinaptosomales

Se incubaron las membranas con una concentración del radioligando $^3\text{H-NMS}$ de aproximadamente 500 pM (concentración cercana al valor de su K_d), y se agregaron concentraciones crecientes de la toxina.

Las membranas se diluyeron en *buffer* PO_4^{3-} , Na^+ , K^+ 50 mM, pH 7.4, hasta una concentración de 0.1 mg de proteína por ml (la estimación de la concentración proteica se realizó siguiendo el método de Bradford, 1976); y se distribuyeron en alícuotas de 0.5 ml por tubo. En cada tubo se agregaron diferentes concentraciones de la toxina en cuestión, o inhibidor, repitiendo por triplicado cada concentración. A todos los tubos se les agregó la misma concentración de radioligando. Se prepararon también cinco tubos en los que no se adicionó toxina: tres se destinaron para la determinación de la unión total del ligando marcado y dos para la unión inespecífica (en presencia de 1 mM del antagonista muscarínico atropina sin marca). La unión específica se estimó sustrayendo el valor de la unión inespecífica de la total.

Primero se realizó una preincubación con inhibidor durante 30 min. a 4°C; y luego, la incubación con radioligando en baño con agitación, durante 1 h a 37°C. Se finalizó la incubación con el agregado de 5 ml del mismo *buffer* fosfato frío, y por filtrado inmediato bajo presión negativa, a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/B), en un aparato Millipore para filtrado simultáneo en 12 posiciones, conectado a una línea

de vacío. Los filtros se lavaron dos veces con 3 ml del mismo buffer y se colocaron en viales de plástico.

Se secaron los filtros en estufa a 70°C; luego se agregaron 3 ml de líquido centelleador: 5 g/L de 2,5-diphenyl-oxazole (PPO) en xileno. Se midieron las muestras en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

Preparación de membranas sinaptosomales para ensayos de actividad AC

En el caso de membranas sinaptosomales destinadas a los ensayos de actividad de adenilato ciclasa, se procedió de igual forma que en el caso de las membranas para unión específica de radioligandos, excepto por la última centrifugación que se realizó a 27000 x g durante 20 min y por la utilización, para el *shock* hiposmótico, de *buffer* HEPES/NaOH 10 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.4. La resuspensión final del *pellet* se hizo en *buffer* de incubación: HEPES/NaOH 50 mM, MgCl₂ 2.3 mM, EGTA 0.3 mM, 3-isobutil-metilxantina 6 mM (IBMX: inhibidor de la fosfodiesterasa), fosfocreatina 15 mM, creatina fosfoquinasa 150 U/ml, albúmina bovina 1.5 mg/ml, bacitracina 0.3 mg/ml, aprotinina 75 mg/ml, pH 7.4. Los volúmenes de resuspensión fueron 2 ml para hipocampo y 0.5 ml para amígdala por cada rata utilizada; la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976).

Ensayos de actividad de adenilato-ciclasa

Para evaluar la actividad de adenilato ciclasa se utilizó la metodología descrita por Salomon y col. (1974) modificada por Orianas y col. (1998).

La incubación se inició con el agregado de 30 µl de la preparación de membranas antes mencionada (30-40 mg de proteína), a 70 µl de *buffer* de incubación HEPES/NaOH 50 mM, MgCl₂ 2.3 mM, EGTA 0.3 mM, conteniendo α³²P-ATP 0.2 mM (45-60 cpm/pmol) en ausencia y presencia de forskolina (FSK) y/o de los agonistas/antagonistas muscarínicos. En todos los ensayos se incubaron membranas sinaptosomales de amígdala o de hipocampo sin o con FSK, para determinar la síntesis de AMPc en condiciones basales y de estimulación. Además se realizaron “blancos” de la determinación, a los que no se les adicionaron membranas. Para estimar la capacidad de

recuperación lograda en las cromatografías secuenciales, se adicionó a cada muestra ^3H -AMPc (150 cpm/nmol, 0.5 mM).

Luego se incubó a 37°C durante 20 min. La reacción fue detenida con el agregado de 100 μl de solución *stopping* (ATP 40 mM, SDS 2 %, pH 7.5) y 0.8 ml de agua.

El posterior aislamiento de ^{32}P -AMPc formado se consigue por cromatografía secuencial en columnas de resina de intercambio iónico Dowex 50 WX8 (SIGMA), y en columnas de alúmina (Salomon y col., 1974). Se siembran las muestras en las columnas de Dowex (1 ml de resina) y se descartan la primera elución y dos lavados con 1 ml de agua cada uno. Luego se agregan 3 ml de agua que son recogidos en las columnas de alúmina, en donde se mezclan con 200 μl de *buffer* imidazole 1.5 M, pH 7.2, (concentración final 0.1 M). La fracción que eluye de las columnas de alúmina se colecta en viales junto con un lavado de 1 ml con *buffer* imidazole 0.1 M, pH 7.5. En cada uno de los viales se agrega *cocktail* centelleador para muestras acuosas (Optiphase Hi-safe2, Wallack), y se colocan los viales en el contador de centelleo líquido para muestras radioactivas.

Los datos del contador expresados en cuentas por minuto, son analizados en el programa MSEXcel, donde se calcula la eficiencia de conteo comparando los valores de un estándar interno del contador con los obtenidos para curvas estándar de ^3H y ^{32}P , obtenidos previamente. Por último, se corrigen los datos con respecto a la recuperación, estimada a partir de las cuentas observadas en el canal de tritio.

Análisis de los datos de bioquímica

Los datos de actividad de AC y de unión de radioligandos fueron analizados mediante la utilización de los programas MSEXcel y GraphPad Prism (versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Los resultados obtenidos del contador de centelleo líquido, expresados en cuentas por minuto (cpm), fueron transformados a desintegraciones por minuto (dpm) y luego a porcentaje de unión con respecto a las cuentas totales (sin toxinas), previa resta de la unión inespecífica. Todos estos cálculos se realizaron en planillas de cálculo del programa Excel de Microsoft. El ajuste no lineal de datos de los ensayos de unión de radioligandos, para determinar las constantes de unión, se hizo utilizando el programa GraphPad Prism.

Por último se contrastaron, con el mismo programa, dos modelos: uno de competencia de dos ligandos por dos sitios de unión contra un modelo de competencia de dos ligandos por un sitio de unión, para evaluar el mejor ajuste.

Ecuación de competencia de dos ligandos por dos sitios:

Span = Unión máxima – máximo de desplazamiento

Parte1 = $\text{Span} \cdot \text{Fracción1} / (1 + 10^{(X - \text{LogEC50}_1)})$

Parte2 = $\text{Span} \cdot (1 - \text{Fracción1}) / (1 + 10^{(X - \text{LogEC50}_2)})$

Y = máximo de desplazamiento + PARTE1 + PARTE2

Supuestos: Ambos sitios tienen igual afinidad por el radioligando.

El eje de las abscisas representa al ligando sin marcar, en escala logarítmica, y el eje de las ordenadas representa al radioligando unido.

La fracción1 representa la proporción de sitios con el EC50₁.

Cada EC50 corresponde a una población de sitios, siendo la concentración de ligando correspondiente a un punto de inflexión de la curva sigmoidea.

Ecuación de competencia de dos ligandos por un sitio:

$Y = \text{máximo de desplazamiento} + (\text{Unión máxima} - \text{máximo de desplazamiento}) / (1 + 10^{(X - \text{LogEC50})})$

El eje de las abscisas representa al ligando sin marcar en escala logarítmica y el eje de las ordenadas representa al radioligando unido.

De estas curvas de competición se calculó la K_i a partir del valor de K_d del radioligando. Los valores de K_i se calcularon aplicando la corrección de Cheng-Prusoff (1973) para la concentración de radioligando, la cual asume una interacción competitiva entre el inhibidor y el ligando en cuestión. El coeficiente de Hill se fijó en 1 para todos los casos.

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

Electrofisiología

Registros de campo

Preparación de rodajas: Se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 250-300 g de peso corporal, se anestesiaron con tiopental (50 mg/kg peso corporal) intraperitoneal y se decapitaron con guillotina. Se removió rápidamente el cerebro y se lo sumergió en fluido cerebrospinal artificial (ACSF) con bajo Ca^{2+} enfriada con hielo (composición del ACSF, en mM: NaCl 130, KCl 3.5, NaH_2PO_4 1.3, Mg^{+2} 5, CaCl_2 0.2, D-glucosa 10 y NaHCO_3 24, gaseado con una mezcla de 95 % O_2 -5 % CO_2 para alcanzar un valor de pH entre 7.3-7.4. Se fijó con pegamento la base del cerebro sobre la platina de un vibrátomo (Vibroslice 725 M, Campden Instruments, USA) y se procedió a realizar cortes horizontales de 400 μm de espesor. Se aislaron las rodajas de hipocampo y se mantuvieron a temperatura ambiente en solución ACSF con Ca^{2+} normal (en mM: NaCl 130, KCl 3.5, NaH_2PO_4 1.3, Mg^{+2} 2, CaCl_2 2, D-glucosa 10 y NaHCO_3 24, pH 7.3-7.4 burbujeado con 95 % O_2 y 5 % CO_2) por no menos de 1.5 h antes de comenzar los registros.

Registros electrofisiológicos: Se colocaron las rodajas en una cámara de interfase y se mantuvo un flujo abierto de líquido cerebro espinal artificial (ACSF, misma composición que el usado para la recuperación de las rodajas) a velocidad constante de 2-3 ml/min. Se reconocieron visualmente, bajo lupa, la región CA1 y el haz de fibras comisurales de Schaffer. Se posicionó el electrodo de estimulación bipolar concéntrico sobre el haz de fibras aferentes y el electrodo de registro (relleno con ACSF, resistencia de $\sim 10 \text{ M}\Omega$) en la *zona radiata* de CA1. Se registraron los potenciales evocados, una vez que se obtuvieron respuestas de 4-10 mV de amplitud y con *population-spike* apenas detectable. En estas condiciones se fijó la frecuencia de estimulación en 0.05 Hz y se obtuvieron respuestas basales estables por 10 min antes del suministro de drogas y del protocolo de inducción del LTP. Ya inducida la LTP, se continuaron los registros por no menos de 50 minutos.

Suministro de drogas: Las drogas se administraron de forma aguda mediante la aplicación desde una pipeta de vidrio (estirada en *puller* Sutter P-87, Sutter Instruments,

USA) conectada a una línea de presión (PV830 Pneumatic Pico Pump WPI; como en Salamoni y col., 2005) sobre la región de registro, 2 min antes de la inducción de LTP.

Protocolo de inducción de la LTP: La potenciación se indujo mediante estimulación tetánica a 100 Hz (HFS: 4 trenes a 100 Hz de 1 seg de duración cada uno, separados por intervalos de 20 segundos, 0.2 milisegundos de duración de cada pulso).

Registros de *whole-cell*

Cultivos organotípicos de hipocampo: se utilizaron hipocampos extraídos de ratas de 6-7 días de edad postnatal. Se prepararon rodajas de 100 μm de espesor mediante un *tissue-chopper* y se colocaron de a cuatro por membrana de cultivo (Stoppini y col., 1991). Se mantuvieron las rodajas en cultivo por 6-10 días antes de realizar los experimentos de electrofisiología.

Registros electrofisiológicos: Se obtuvieron los registros *whole-cell* en la modalidad de fijación de voltaje de células piramidales de la región CA1, utilizando microscopía de luz transmitida como guía visual. La cámara de registro se perfundió con ACSF con la siguiente composición: NaCl 119 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 4 mM, MgCl₂ 4 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, glucosa 11 mM, picrotoxina 0.1 mM y 2-cloroadenosina 1 μM , pH 7.4.

50 ml de ACSF se hicieron circular en un circuito cerrado, movilizados por una bomba peristáltica y burbujeado con CO₂ / O₂ (5 / 95 %) y se mantuvieron a 27°C. Las pipetas de registro de parche, con una resistencia de 6-4 M Ω , se llenaron con solución intracelular con la siguiente composición: metanosulfonato de cesio 115 mM, CsCl 20 mM, HEPES 10 mM, MgCl₂ 2.5 mM, Na₂ATP 4 mM, Na₃GTP 0.4 mM, Na-fosfocreatina 10 mM y EGTA 0.6 mM, pH 7.25.

Se indujeron las respuestas evocadas mediante estimulación de las fibras colaterales de Schaffer con electrodos bipolares a una distancia aproximada de 250 μm del soma de la neurona registrada (frecuencia de estimulación: 0.3 Hz). Dentro de los 1.5-2 min de obtenido el acceso *whole-cell* se suministró el protocolo de inducción de LTP. Se registraron las respuestas evocadas manteniendo el potencial de membrana fijo en -60 mV, todos los registros se realizaron estimulando dos vías sinápticas independientes.

Suministro de drogas: Las drogas fueron aplicadas al volumen de ACSF circulante (50 ml volumen total) de manera de alcanzar las concentraciones finales deseadas. En los experimentos con inducción de LTP las drogas estuvieron presentes a lo largo de todo el registro, antes y después de la inducción.

Protocolo de inducción de la LTP: La LTP se indujo mediante un protocolo de dos estímulos pareados únicamente en una de las dos vías sinápticas de cada neurona bajo registro, mientras la otra se mantuvo como control interno sin que se alterara su estimulación. El apareamiento de estímulos para la inducción de LTP consistió en llevar la frecuencia de estimulación a 3 Hz y el potencial de membrana postsináptica a 0 mV, durante 2 min. Finalizado el protocolo de inducción se volvió a fijar el potencial de membrana en -60 mV y se retomó la frecuencia de 0.3 Hz para las dos vías registradas, por no menos de 40 min.

Análisis de los registros de electrofisiología

Tanto para los registros de campo como para los de *whole-cell*, se utilizó el programa ClampFit 9.2 de Axon Instruments. En el primer caso, el parámetro que se tuvo en cuenta para realizar el análisis fue la pendiente del PEPS (mV/ms), mientras que en el segundo se midió la amplitud del CEPS (pA). Una vez obtenidos los valores de estos parámetros para cada registro, se transfirieron a una planilla de cálculo del programa Excel de Microsoft para la manipulación estadística, la confección de los gráficos correspondientes se realizó mediante el programa GraphPad Prism.

Los resultados obtenidos de los experimentos de actividad basal se ajustaron a un modelo exponencial mediante el programa GraphPad Prism.

Ecuación del modelo de *plateau* seguido de decaimiento exponencial de una fase

$$Y = \text{Plateau} + (Y_0 - \text{Plateau}) * \exp(-K * (X - X_0))$$

Ecuación del modelo de *plateau* seguido de asociación de una fase

$$Y = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) * (1 - \exp(-K * (X - X_0)))$$

X_0 es el tiempo de comienzo del decaimiento, Y_0 es el valor promedio de Y hasta el tiempo X_0 , *plateau* es el valor de Y en tiempo infinito expresado en las mismas unidades que Y .

K es la constante de velocidad, expresada en la reciproca de las unidades de tiempo del eje X. Si X se expresa en minutos, entonces K se expresa en minutos⁻¹. Tau es la constante de tiempo, expresada en las mismas unidades del eje X. Se computa como la reciproca de K

Comportamiento

Los experimentos de comportamiento se realizaron en el laboratorio del Dr. Jorge Quillfeldt, Laboratorio de Psicobiología y Neurocomputación del Departamento de Biofísica, Universidad Federal de Río Grande del Sur (Porto Alegre, Brasil).

Implantación de cánulas

Las ratas fueron anestesiadas con una solución de ketamina y xilacina (i.p.; 75 y 10 mg/Kg respectivamente). Las coordenadas para inyecciones intracerebrales se determinaron de acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson (1995), a partir de bregma: (AP: antero-posterior; LL: latero-lateral; DV: dorso-ventral), utilizando un aparato estereotáxico para pequeños animales (DK). Se hicieron pequeñas trepanaciones bajo anestesia y se implantaron cánulas de acero de 27-gauge, apuntando 1.00 mm por encima de la amígdala, en ambos hemisferios.

Coordenadas para la ubicación de las cánulas:

AP = - 0,23 cm

LL = + 0,45 cm

DV = - 0,45 cm

Entrenamiento en una tarea de evitación inhibitoria

Al recuperarse de la cirugía (3-4 días) los animales fueron entrenados en una tarea de evitación inhibitoria.

En la sesión de entrenamiento, la rata fue colocada suavemente sobre una plataforma (2.5 cm de altura, 7.0 cm de ancho, 25.0 cm de largo) ubicada en el costado izquierdo de una caja de acrílico de 50 x 25 x 25 cm, cuyo piso consiste en barras paralelas de acero inoxidable de 0.1 cm de calibre, espaciadas en 1.0 cm (figura 2.1). Se midió el tiempo que tardó el animal en bajar de la plataforma, apoyando las cuatro patas sobre la grilla, tanto en el entrenamiento como en el test, realizado 24 hs más tarde. Durante el entrenamiento el animal recibió un choque eléctrico (3.0 seg, 0.5 mA) al apoyar las cuatro patas sobre la grilla. En cambio, durante la sesión de retención (test), no recibió choque eléctrico; las latencias fueron acotadas a un máximo de 300 seg.

Luego de las pruebas se sacrificaron los animales, se extrajeron y se fijaron los cerebros para corroborar la posición de las cánulas.

Entrenamiento en una tarea de campo abierto

La caja para la tarea de habituación a un campo abierto mide 50 cm de altura, 40 cm de ancho y 60 cm de largo, y está dividida en 12 cuadrantes de 15 cm por 13.3 cm. Tanto en la sesión de entrenamiento como en el test, 24 hs después, la rata fue colocada en esta caja durante 5 min y se midió el número de encabritamientos y de cruces de un cuadrante a otro.

Tratamiento farmacológico

Se separó a los animales en grupos que recibieron infusiones bilaterales de 0.5 µl de: MT1, MT2, MT3, pirenzepina, o la solución vehículo; además, un grupo de animales sin operación de canulación acompaña cada experimento. La administración se hizo por cánulas con una aguja 30-gauge conectada a una microjeringa propulsada por bomba (Cole-Parmer 74900).

Análisis de los datos comportamentales

Para datos paramétricos (número de cruces, respuestas de orientación, expresados como media \pm ESM), las comparaciones entre grupos se hacen por Análisis de Varianza de una o dos vías, seguido por test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls, o por test “t” de Student para muestras dependientes o independientes, cuando se trata de dos grupos. Los datos no-paramétricos (diferencias de latencia entre test y entrenamiento en evitación, con límite de tiempo) se expresan como medianas con sus intervalos intercuartiles; se analizan por Análisis de Varianza de Kruskal-Wallis, seguido por test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis.

Toxinas

Las MTs fueron purificadas en el Instituto Clemente Estable (Montevideo, Uruguay) por el Dr. Carlos Cerveñansky y su grupo, a partir del veneno de serpiente *Dendroaspis angusticeps* (Jonathan Leakey Ltd., Kenya). El procedimiento general de purificación involucró siguientes pasos, siguiendo el protocolo de Adem y col. (1988) con algunas modificaciones (ver además Jerusalinsky y col., 1992):

1. Columna de Sephadex G-50 donde se separaron proteínas de entre 7000 y 7500 Da.
2. Cromatografía de intercambio catiónico. Se descartaron los péptidos que se unieron a la resina.
3. Dos pasos sucesivos de purificación en columnas de SP-Sephadex C-25, una con un gradiente de pH y la otra con un gradiente de concentración con acetato de amonio donde se aislaron las fracciones del pico proteico que mostraron actividad muscarínica.
4. Se comprobó la pureza por RP-HPLC.

La concentración del péptido para su uso en los distintos experimentos fue estimada a través de la absorbancia a 276 nm. Las absorbancias para una concentración de toxina de 1 mg/ml ($A_{276\text{nm}}$ 0.1%) son: 2.21 para MT1, 1.36 para MT2 y 1.47 para MT3.

Resultados

Bioquímica

Ensayos de unión específica del radioligando muscarínico $^3\text{H-NMS}$

Con el objetivo de estimar la proporción de los diferentes subtipos de RACHM en tres estructuras de interés para nuestro estudio, se realizaron curvas de desplazamiento del ligando NMS, marcado con tritio, por concentraciones crecientes de las toxinas MT1 y MT3.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos y los ajustes considerando un modelo de un sitio, para MT1, y de dos sitios para MT3, realizados mediante el programa GraphPad Prism. Los valores obtenidos para los parámetros más relevantes se consignan en la tabla 1.

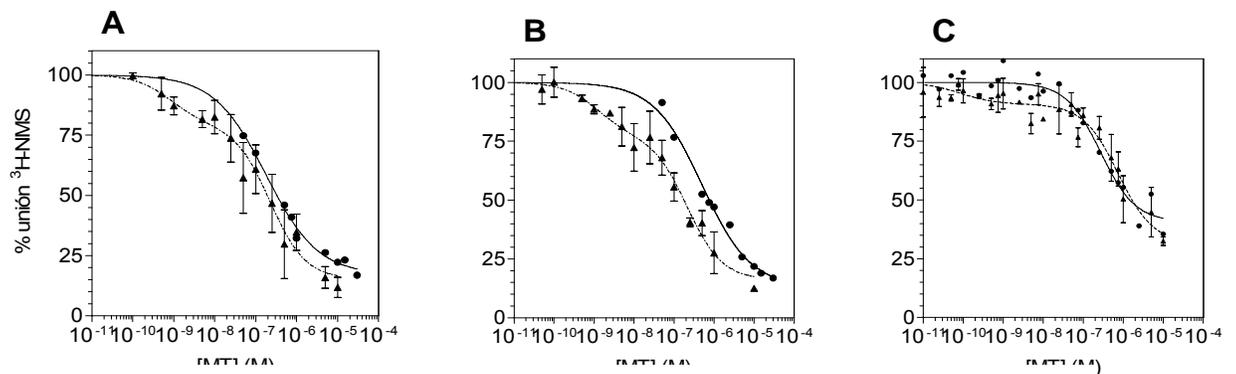


Figura 1 Receptores muscarínicos en hipocampo estriado y amígdala. Curvas de inhibición de la fijación específica de $^3\text{H-NMS}$ por MT1 (círculos) y MT3 (triángulos) en membranas sinaptosomales de hipocampo, $n = 3-8$ (A), estriado, $n = 1-3$ (B) y amígdala, $n = 2$ (C).

	Hipocampo	Estriado	Amígdala
MT1	LogEC50 -6.7 ± 0.1 piso 17.0 ± 2.4	LogEC50 -6.3 ± 0.1 piso 13.0 ± 4.2	LogEC50 -6.6 ± 0.1 piso 40.7 ± 3.3
MT3	LogEC50 ₁ -9.1 ± 0.6 Piso 15.2 ± 6.7 Frac ₁ $24.3 \pm 8.5 \%$	LogEC50 ₁ -8.9 ± 0.4 Piso 16.2 ± 8.2 Frac ₁ $27.9 \pm 7.3 \%$	LogEC50 ₁ -10.1 ± 0.6 Piso 31.6 ± 5.4 Frac ₁ $13.5 \pm 3.1 \%$

Tabla 1 Parámetros de los ajustes a los datos de los ensayos de unión específica. Valores de logaritmo de IC50 y IC50 de alta afinidad (IC50I), piso y fracción de alta afinidad (FracI) obtenidos mediante los ajustes de modelos de un sitio (MT1) y de dos sitios (MT3) para hipocampo ($n = 3-8$), estriado ($n = 1-3$) y amígdala ($n = 2$).

Actividad Adenilato Ciclasa & Receptores Muscarínicos

La participación de los RACHM en la señalización intracelular se da a nivel de la interacción con las proteínas G, siendo los subtipos M2 y M4 los que se acoplan preferentemente a Gi (ver introducción).

Con el objetivo de evaluar el rol de los RACHM en el control de la síntesis de AMPc, se diseñaron experimentos con membranas sinaptosomales para medir la actividad enzimática de la AC. En esta preparación se obtiene un enriquecimiento de las membranas en terminales axónicos y membranas postsinápticas, con prevalencia de los primeros.

Los ensayos de actividad enzimática se hicieron en presencia de diferentes drogas que tienen por blanco los RACHM, la AC y los receptores dopaminérgicos.

Un objetivo también relevante en estos experimentos consistió en determinar si las MTs ensayadas se comportan como agonistas o antagonistas de los RACHM.

Estimulación de la AC por forskolina

Dado que los RACHM que intervienen en la vía del AMPc lo hacen inhibiendo la actividad de AC, en primer lugar realizamos experimentos de activación de AC por medio de FSK, un diterpeno que estimula a nueve de las diez isoformas de la enzima.

La figura 2A muestra los porcentajes de AMPc sintetizado en función de la concentración de FSK, con respecto a la síntesis basal, en membranas sinaptosomales de hipocampo y estriado.

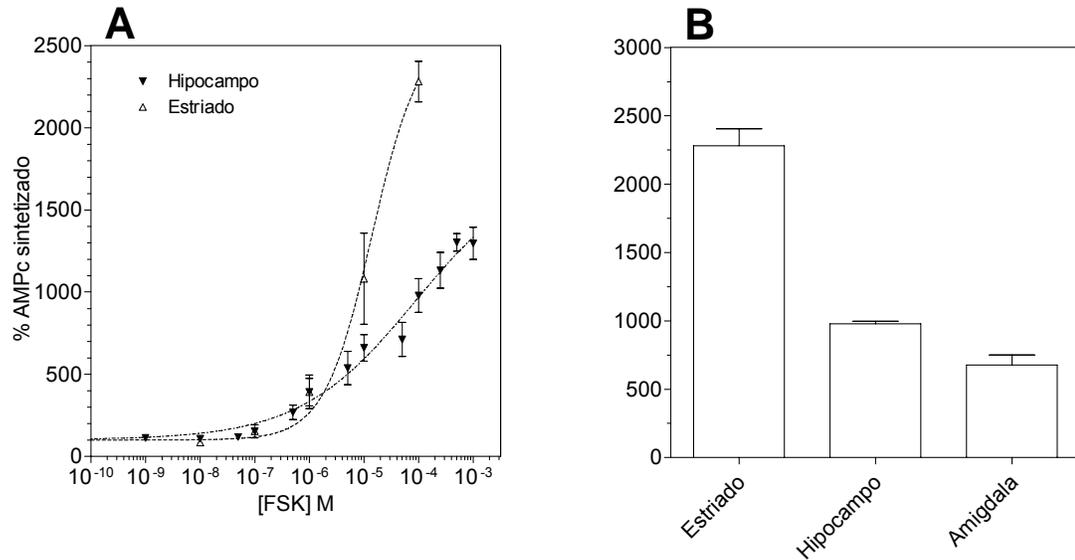


Figura 2 Estimulación de la actividad de Adenilato Ciclasa por forskolina. Panel **A**: valores porcentuales de producción de AMPc referidos al valor de síntesis obtenido en ausencia de FSK considerado como 100 %. Las líneas punteadas representan el ajuste de los datos obtenidos en hipocampo (\blacktriangledown n = 1-30) y en estriado (Δ n = 1-42), a un modelo de dosis-respuesta sigmoideo. El tope de estimulación estimado mediante el modelo resultó 2585 % \pm 269 en estriado y 1783 % \pm 315 en hipocampo.

Panel **B**: Comparación de los promedios de la estimulación obtenida con FSK 100 μ M en las tres estructuras estudiadas. Los valores de cada estructura resultaron (media \pm ESM): estriado 2281.0 \pm 806.3 %, n = 42; hipocampo 978.4 \pm 102.3 %, amígdala n = 30; 676.4 \pm 224.5 %, n = 9.

En la figura 2B se muestra un gráfico de barras consignando los porcentajes de AMPc obtenidos al estimular membranas de hipocampo, estriado y amígdala con FSK 100 μ M. De la comparación surge que la sensibilidad a la estimulación por FSK es marcadamente diferente en cada estructura: el estriado es el que responde con mayor intensidad, alcanzando un aumento de la síntesis relativa al basal de más de un 2000 %; lo sigue el hipocampo, con un incremento del orden del 1000 % y amígdala con poco más de un 500 %.

	Hipocampo	Estriado	Amígdala
basal	3.8 ± 0.9	33.0 ± 1.2	3.3 ± 0.8
forskolina 10 ⁻⁷ M	5.8 ± 0.5	50.6 ± 13.2	
10 ⁻⁵ M	14.9 ± 3.8	129.1 ± 27.4	13.4 ± 1.6
10 ⁻⁴ M	25.1 ± 3.1	752.7 ± 40.9	22.0 ± 2.4
dopamina 10 ⁻⁶ M	4.0 ± 0.1	33.1 ± 3.7	
10 ⁻⁴ M	4.1 ± 0.1	48.5 ± 2.9	
10 ⁻³ M	4.4 ± 0.2	54.9	

Tabla 2 Producción de AMPc en condiciones basales y por estimulación con forskolina en las tres estructuras.

Expresados como medias de los valores absolutos de producción de AMPc en nmol de [³²P]-AMP cíclico / total proteína mg * minuto⁻¹ medias ± .ESM (n ≥ 4)

Las tres estructuras mostraron no sólo diferencias de sensibilidad a FSK, sino que también difieren en el valor absoluto de síntesis basal de AMPc sin estimulación con FSK, como era de esperar: en la tabla 2 se puede apreciar que los valores absolutos de síntesis basal más altos corresponden a estriado, seguido por hipocampo y amígdala, en segundo y último lugar respectivamente.

De estos resultados se puede concluir que cada una de las tres estructuras estudiadas expresaría una concentración y composición de isoformas de AC particular, posiblemente con diversa localización.

Los siguientes experimentos se realizaron con una concentración de AC de 100 µM, que permitió obtener una buena estimulación de la actividad de AC sin llegar a valores de saturación, de manera que fuera factible observar efectos de modulación.

Rol de los RACHM en la modulación de AC

Los experimentos que siguen se realizaron con el objetivo de analizar la capacidad de los RACHM de controlar la síntesis de AMPc, para lo cual se realizó una curva de concentración del agonista muscarínico no selectivo oxotremorina, en presencia de FSK 100 µM.

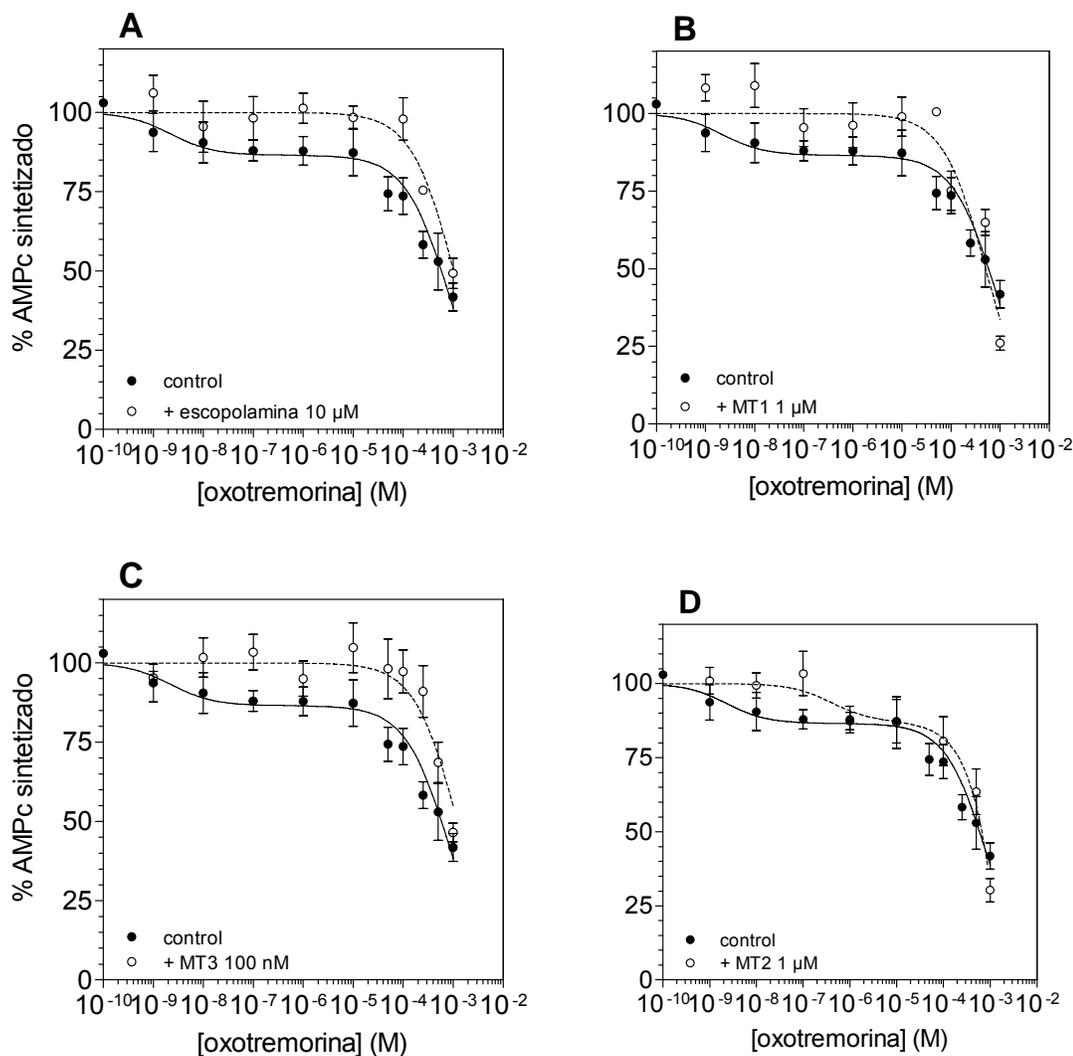


Figura 3. Receptores muscarínicos y actividad adenilato ciclasa en hipocampo. Los círculos negros representan los valores medios de inhibición de la síntesis de AMPc, estimulada con FSK 100 μ M, producida por diferentes concentraciones del agonista muscarínico oxotremorina ($n = 1-25$); la línea continua representa el ajuste a un modelo de dos sitios de inhibición. (A) En círculos blancos se representan los valores promedio obtenidos con el agregado de: escopolamina 10 μ M ($n = 2-7$); (B) en círculos blancos, los valores promedio obtenidos con agregado de MT1 1 μ M ($n = 3-6$); (C) en círculos blancos, valores promedio con el agregado de MT3 0.1 μ M ($n = 4-6$) y (D) en los valores promedio con MT2 1 μ M (D) ($n = 4-6$); las líneas punteadas representan los respectivos ajustes a un modelo de un sitio de inhibición.

En la figura 3A se muestran los resultados obtenidos en membranas de hipocampo: los círculos negros representan los porcentajes de AMPc sintetizados, relativos a la síntesis en ausencia de oxotremorina, considerada como 100 %. Se observa una primera inhibición a bajas concentraciones de agonista (de alta afinidad), que se mantiene más o menos estable mientras se aumenta la concentración de oxotremorina hasta que, en el rango de concentraciones milimolar, se produce una segunda inhibición con características diferentes a la primera.

Los valores tuvieron un ajuste mejor a un modelo de dos sitios de inhibición, comparado con el ajuste a un modelo de un único sitio, con un $P < 0.0001$ según la comparación realizada por el programa GraphPad. Los parámetros calculados fueron: IC_{50_1} (del primer paso inhibitorio) -8.7 ± 0.8 , la fracción de la primera inhibición representó el $13.5 \pm 2.8 \%$, y la IC_{50_2} (segundo paso inhibitorio) fue -3.1 ± 0.2 .

En la misma figura, los círculos blancos representan los porcentajes de AMPc sintetizados en presencia de concentraciones variables del agonista, más el antagonista escopolamina $10 \mu\text{M}$. De esta forma se bloquean los receptores con el antagonista y los efectos que permanecen se pueden atribuir a acciones inespecíficas del agonista. En esta situación se revirtió el primer paso inhibitorio, mientras que el segundo no fue afectado; los resultados se ajustaron mejor a un modelo de un único sitio de inhibición, de acuerdo a la comparación por el programa GraphPad Prism. Con estos resultados estamos en condiciones de afirmar que la inhibición específica muscarínica es exclusivamente la de alta afinidad del agonista.

En la figura 3B se observa la misma curva dosis respuesta en función del agonista que en la figura anterior, y la curva con el agregado de MT1 $1 \mu\text{M}$, círculos blancos. El agregado de la toxina produjo un efecto similar al del antagonista y los datos ajustaron mejor al modelo de un sitio, comparado con el de dos sitios.

En la figura 3C se muestra en círculos blancos la síntesis de AMPc en presencia de MT3 $0.1 \mu\text{M}$ que, nuevamente, resultó similar a lo que ocurrió en presencia del antagonista escopolamina (Fig. 3A).

Por último, se observa en la figura 3D un tipo de experimento similar a los anteriores, esta vez en presencia de MT2 que, como las otras toxinas, revirtió la inhibición de alta afinidad de forma semejante al antagonista escopolamina.

Tomados en conjunto, estos datos indican que las tres toxinas, MT1, MT2 y MT3, cuya unión al receptor M2 es despreciable (ver introducción figura 2), actuaron como antagonistas del receptor M4. Y como consecuencia de su acción, podemos afirmar que la porción detectable de regulación muscarínica de la actividad AC en hipocampo, se correspondería con una modulación ejercida principalmente por el receptor M4.

En la figura 4 se muestran los porcentajes de síntesis de AMPc en función de la concentración de oxotremorina en membranas de estriado, representados en círculos negros. Estos resultados ajustaron mejor a un modelo de dos sitios (Log IC_{50_1} : -9.6 ± 0.7 , fracción 1: $6.8 \pm 4.2 \%$; Log IC_{50_2} : -2.7 ± 0.4), comparado con el ajuste al modelo de un solo sitio. Con el agregado de la toxina MT1 $1 \mu\text{M}$ se revirtió la primera fase inhibitoria, sin producirse modificaciones en la segunda; por el mismo programa se obtuvo un ajuste más adecuado para el modelo de un solo sitio de unión.

Dado el bajo porcentaje de la actividad total de AC regulado por los MACHRs, valor cercano a la dispersión de la técnica de detección de actividad, y la consiguiente dificultad de interpretación de los resultados obtenidos, no resultó adecuada la estimulación de AC por FSK en esta estructura para el estudio de la regulación muscarínica de AC.

En experimentos con dopamina, que se relatan más adelante, pudimos resolver en parte esta dificultad.

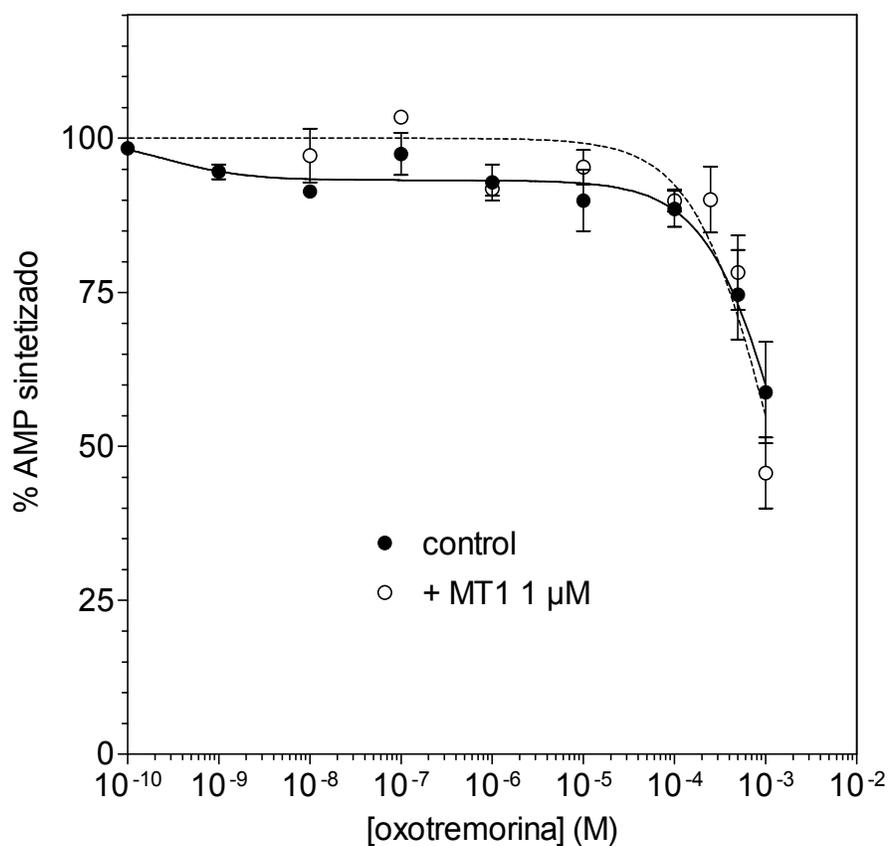


Figura 4. Receptores muscarínicos y actividad adenilato ciclasa en estriado. En círculos negros se representan las medias (\pm ESM) de los valores de inhibición de la síntesis de AMPc por oxotremorina en concentraciones variables, en presencia de FSK 100 μ M (n = 1-11); la línea continua representa el ajuste de un modelo de dos sitios de inhibición. En círculos blancos se representan las medias (\pm ESM) de los valores de AMPc sintetizados con el agregado de MT1 1 μ M (n = 3-8); la línea punteada representa el ajuste de un modelo de un sitio de inhibición.

Posteriormente, quisimos descartar la posibilidad de que las toxinas tuvieran un efecto *per se* sobre la actividad AC, para lo cual realizamos ensayos en ausencia del agonista.

En la figura 5 se muestran los porcentajes de síntesis de AMPc con respecto a la actividad estimulada con FSK 100 μ M tomada como 100 %, en presencia de MT1 y MT3 (5A en membranas de hipocampo, 5B en membranas de estriado).

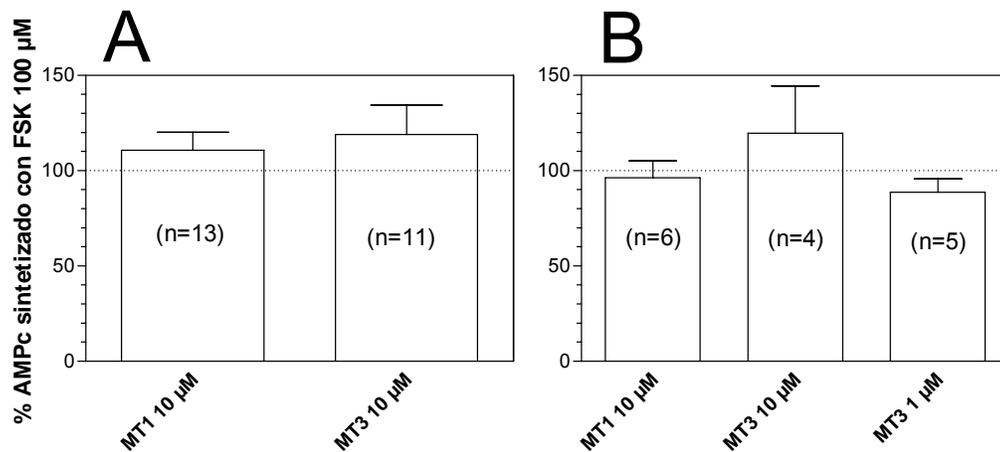


Figura 5. Efecto de MT1 y MT3 sobre la actividad de AC estimulada por FSK. Valores porcentuales de producción de AMPc referidos al valor de síntesis obtenido en ausencia de dopamina considerado como 100 %. Las barras representan los promedios de síntesis en presencia de las diferentes concentraciones de las toxinas en hipocampo (A) y en estriado (B).

En la figura 6 se muestran los porcentajes de síntesis de AMPc en membranas de estriado en función de diferentes concentraciones de MT3, tomando como 100 % la actividad basal.

Sólo a concentraciones superiores a 25 μ M se evidenció un efecto de MT3 sobre la actividad basal de AC, dado que en el resto de los experimentos de esta tesis la concentración de la toxina se mantuvo por debajo de tal valor, podemos descartar que en dichos experimentos haya habido un efecto *per se* de MT3.

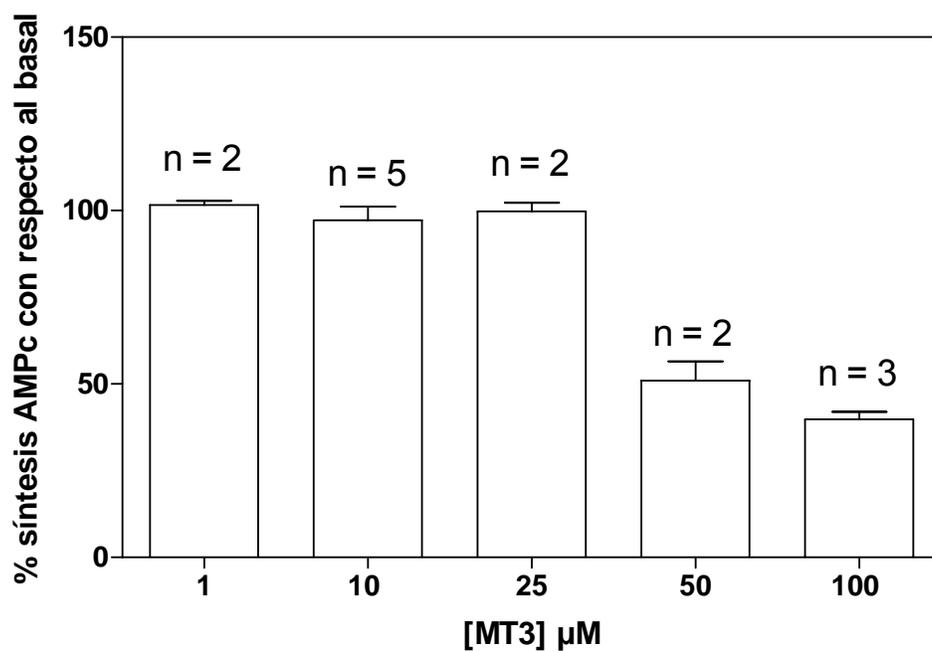


Figura 6. Efecto de MT3 sobre la actividad basal de adenilato ciclasa en estriado. No se detectó efecto significativo sobre la actividad de AC con concentraciones de MT3 hasta 25 μM . Al aumentar la concentración de MT3 hasta 50 y 100 μM , la toxina produjo una disminución significativa de la síntesis de AMPc.

De la falta de efecto *per se* en ausencia del agonista y del efecto de reversión de la inhibición por el mismo, se puede concluir que estas toxinas quedan caracterizadas como antagonistas para el receptor M4, al menos respecto de la modulación de la AC.

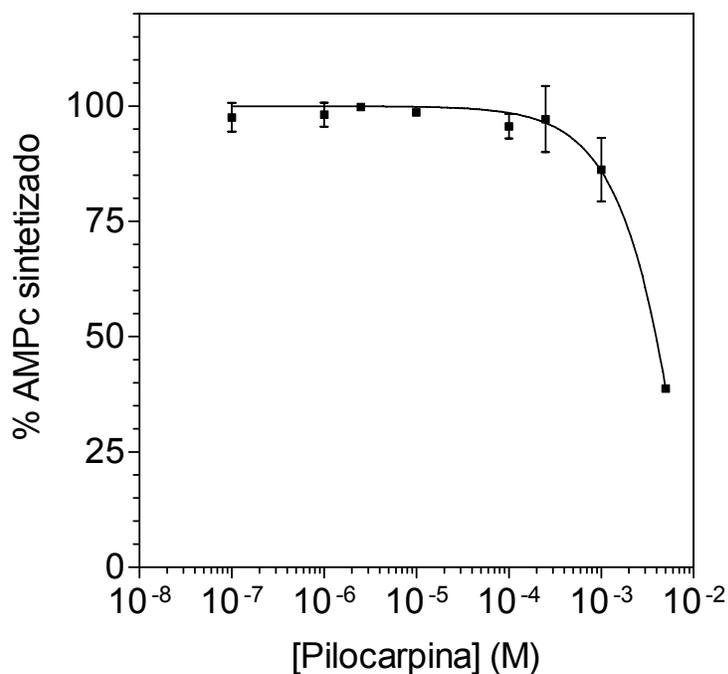


Figura 7. Receptores muscarínicos y actividad adenilato ciclasa en amígdala. Valores promedio de síntesis de AMPc en presencia de FSK 100 μ M, frente a concentraciones variables de pilocarpina (n = 1-4); la línea continua representa el ajuste de un modelo de un sitio de inhibición.

En membranas de amígdala se probaron diferentes agonistas muscarínicos (oxotremorina, carbacol y pilocarpina) para realizar curvas dosis-respuesta.

La única inhibición de la AC detectable en las condiciones de nuestros experimentos, ocurrió a altas concentraciones del agonista. En la figura 7 se muestra la curva correspondiente a pilocarpina. Tal efecto inhibitorio no pudo ser revertido con el agregado de escopolamina.

En consecuencia, concluimos que no se pudo evidenciar un control muscarínico de la síntesis de AMPc en esta estructura.

Estimulación de AC por dopamina

Con la intención de investigar la relación entre la estimulación de AC por otros neuroreceptores involucrados y su regulación muscarínica, nos propusimos obtener la estimulación de la síntesis de AMPc por medio de receptores que acoplen a la AC por proteínas Gs. A su vez, estaríamos simulando en nuestro sistema experimental condiciones que, posiblemente, tendrían más relación con las fisiológicas.

El neurotransmisor dopamina actúa sobre receptores metabotrópicos de dos tipos: los subtipos D1 y D5 activan las proteínas Gs, mientras que los D2, D3 y D4 activan Gi (Basic Neurochemistry, 7th ed).

Se intentó sin éxito estimular la AC por medio de los subtipos D1 de receptores dopaminérgicos con el empleo del agonista selectivo CI-APB. Posteriormente se utilizó dopamina y se realizaron los ensayos para obtener las curvas dosis-respuesta.

En la figura 8 se muestran los valores de estimulación relativa de la síntesis de AMPc en función de la concentración de dopamina, para membranas sinaptosomales de hipocampo (círculos negros) y estriado (círculos blancos). Se ajustaron los datos obtenidos, a sendas curvas sigmoideas de pendiente variable, cuyos parámetros de estimulación máxima resultaron 116.3 ± 7.1 % para hipocampo y 145.4 ± 7.0 %, para estriado.

En vista de los resultados obtenidos con FSK, era de esperar una mayor estimulación de la actividad AC en estriado con respecto a hipocampo. Esto fue lo que ocurrió efectivamente, tanto para los valores de síntesis porcentuales referidos al basal, como para los valores de síntesis absolutos (Tabla 2).

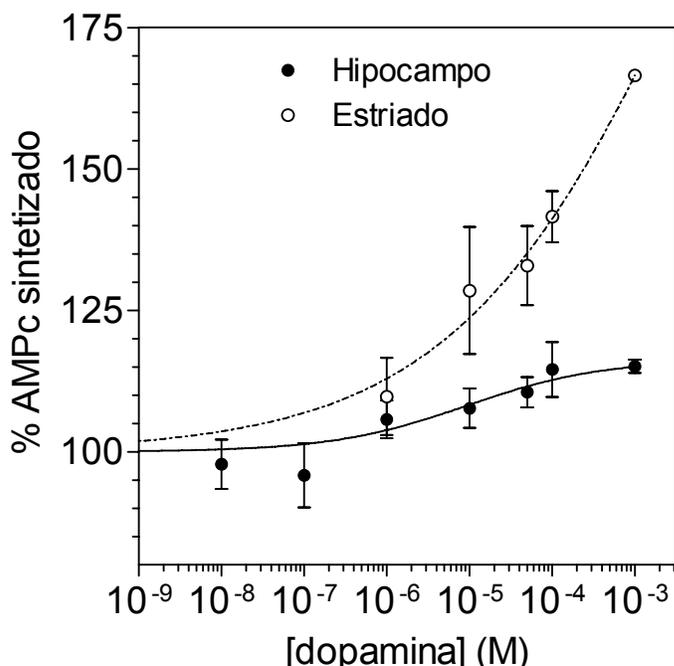


Figura 8 Estimulación de la actividad de Adenilato Ciclasa por dopamina. Valores porcentuales (promedio \pm ESM) de la producción de AMPc referidos al valor de síntesis obtenido en ausencia de dopamina, tomado como 100 %. Las líneas representan los ajustes a un modelo de dosis-respuesta sigmoide de pendiente variable de los datos obtenidos en hipocampo (●) y en estriado (○), $n = 2-21$ salvo para el punto de máxima concentración de dopamina en estriado que no tiene réplica.

Efecto del agonista muscarínico en presencia de dopamina 100 μ M

Debido a que la escasa estimulación de la actividad de AC conseguida en hipocampo no permitiría un margen detectable y confiable para el juego de la inhibición muscarínica, los siguientes experimentos se realizaron únicamente con membranas de estriado en presencia de dopamina 100 μ M.

En la figura 9 se muestran los valores de la síntesis de AMPc en presencia de dopamina 100 μ M. Se registró un aumento del 141.6 ± 4.5 % sobre el promedio basal (tomado como 100 %), y se ensayaron tres concentraciones diferentes de oxotremorina, que produjeron una consecuente inhibición de la síntesis previamente estimulada, cercana al 50 % (dopamina 100 μ M + oxotremorina 10 μ M: 121.2 ± 3.9 %); a su vez hubo una completa reversión de la inhibición muscarínica en presencia de MT3 10 μ M, y la síntesis de AMPc retornó a un valor de 144.2 ± 5.4 %.

Estos resultados permiten concluir que, en estas condiciones, tampoco fue posible la detección de alguna participación del receptor M2 en el control muscarínico de la síntesis de AMPc y, por lo tanto, la inhibición producida por el agonista oxotremorina puede ser atribuida enteramente a la activación del receptor M4.

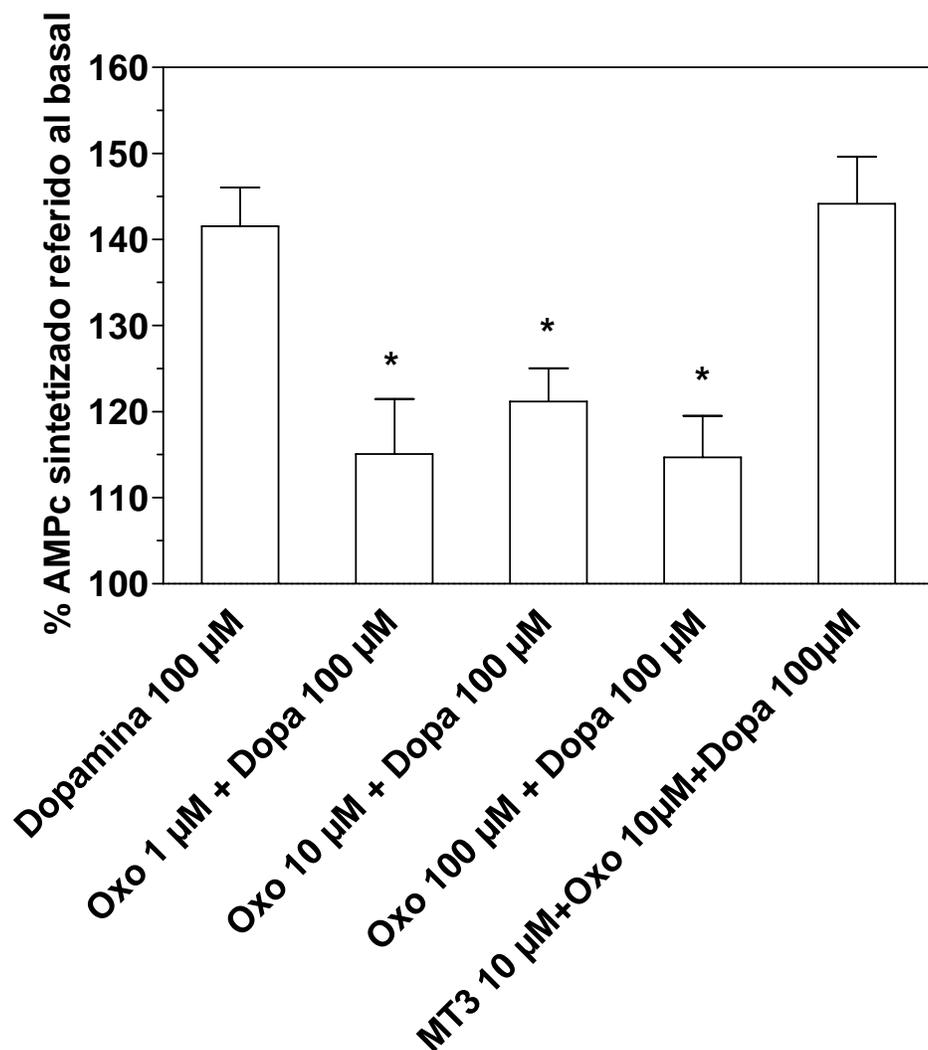


Figura 9 Regulación dopaminérgica y colinérgica de la actividad de Adenilato Ciclasa en estriado.

Valores promedio de la síntesis de AMPc \pm ESM: dopamina aumentó la síntesis hasta un valor del 141.6 ± 4.5 % (respecto del basal considerado como 100 %) (n = 21); el agregado de oxotremorina redujo la estimulación hasta un valor de 121.2 ± 3.9 % (n = 18) y MT3 revirtió tal inhibición restituyendo la síntesis a un valor de 144.2 ± 5.4 % (n = 10). Se detectaron diferencias significativas por ANOVA y luego, la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, permitió establecer la significación del efecto inhibitorio de oxotremorina frente a la estimulación por dopamina y la reversión por MT3 (asteriscos, $P < 0.05$)

Experimentos de electrofisiología

Registros de fijación de voltaje en célula entera, *patch-clamp whole-cell*: Efecto de las MTs sobre la conducción basal

Se obtuvieron registros de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) en neuronas piramidales de CA1 del hipocampo, utilizando cultivos de rodajas de cerebro de ratas jóvenes. Debido a que se mantuvo el voltaje fijo en -60 mV, las corrientes registradas se correspondieron principalmente con las atribuibles a los receptores ionotrópicos de glutamato AMPA; además, por haber incluido picrotoxina (100 μ M) en el ACSF circulante (circuito cerrado), se eliminaron las corrientes inhibitorias promovidas por el neurotransmisor GABA.

Se registró la actividad evocada basal por 5 minutos y luego se agregaron las MTs; se continuó registrando por otros 20 minutos, con las toxinas presentes en el ACSF, en una concentración de 100 nM.

En la figura 10 se graficó la amplitud de las corrientes evocadas, normalizadas al valor promedio basal (primeros cinco minutos), a lo largo de los 20 minutos que se mantuvo el registro. Al término de los primeros cinco minutos de registro se agregaron las MTs al ACSF circulante, de forma de que alcanzaran una concentración final de 100 nM.

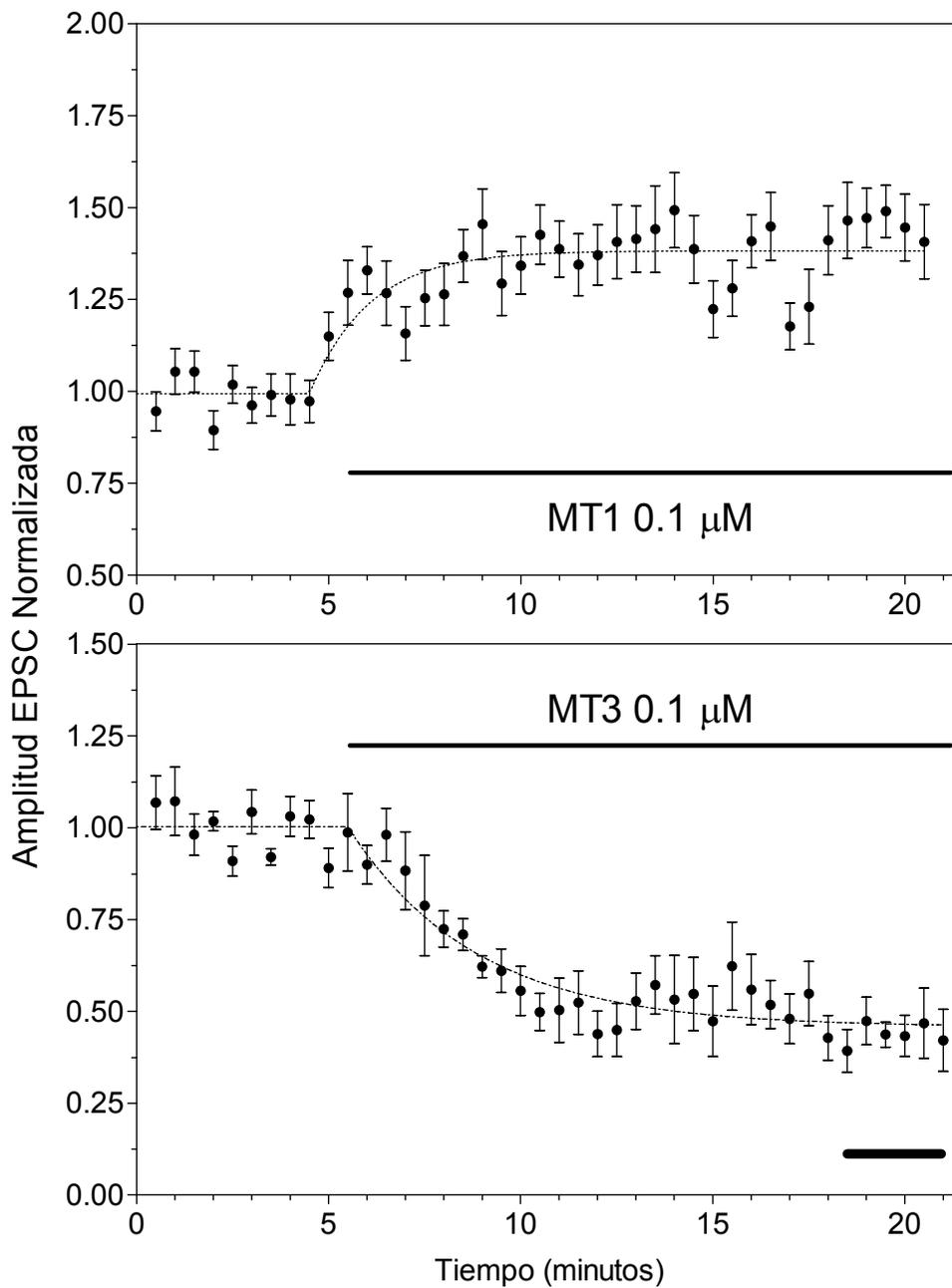


Figura 10 Efecto de las MTs sobre transmisión basal. El agregado de MT1 0.1 μM produjo un incremento de la amplitud de las corrientes excitatorias postsinápticas que alcanzó un 40 % (panel superior, n = 5). Por el contrario, MT3 0.1 μM produjo una disminución de las corrientes que alcanzó un 60 % (panel inferior, n = 6). Cada punto representa la media ± ESM, las líneas punteadas representan el ajuste de los datos obtenidos a un modelo de exponencial simple.

La inclusión de MT1 en el medio de perfusión provocó un incremento paulatino de la transmisión, que alcanzó un máximo estable, al finalizar el registro, de cerca de un 40 % por sobre el nivel basal (estadística fig 11). Se ajustaron los datos obtenidos a un modelo exponencial, a fin de calcular los parámetros de la facilitación producida por la toxina (fig 10, panel superior). De acuerdo al ajuste logrado mediante el programa GraphPad Prism, el valor de *plateau* de la facilitación se ubicaría en 1.383 ± 0.018 de amplitud EPSC, y una constante de tiempo Tau igual a 1.156 minutos.

En la figura 10 (panel inferior) se muestran los valores normalizados de la amplitud de las respuestas evocadas en los experimentos en los que se usó MT3 que, contrariamente a lo observado con MT1, produjo una depresión de la actividad evocada que, al cabo de 20 minutos, se estabilizó en un valor cercano al 40 % con respecto al basal (estadística fig 11). Los datos obtenidos se ajustaron aun modelo exponencial y se estimó el valor de *plateau* de la inhibición en 0.431 ± 0.019 de amplitud EPSC, con una constante de tiempo Tau de 3.814 minutos.

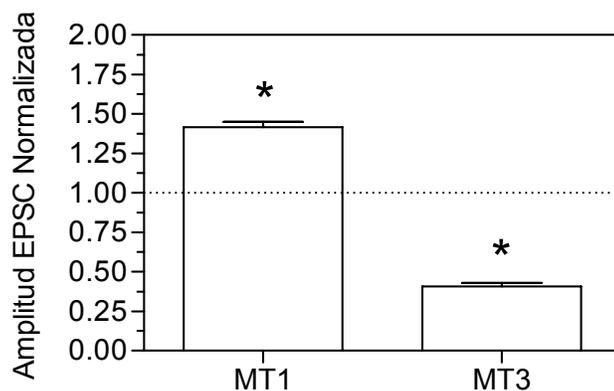


Figura 11 Análisis estadístico de los datos de la fig. 10.

Se promediaron los valores de EPSC correspondientes a los últimos 3 minutos de registro. Los promedios resultaron (media ± ESM): 1.42 ± 0.03 para MT1; 0.41 ± 0.02 para MT3. Ambas medias fueron significativamente diferentes de 1, $P < 0.0001$ por t de Student.

Estos resultados sugieren que tanto el receptor M1 como el M4 estarían modulando la eficiencia de la transmisión sináptica en esta región de CA1, posiblemente la mayor parte de tal efecto sería regulando las corrientes a través de los receptores AMPA aunque podría haber también una modulación de las corrientes NMDA dado que no están completamente anuladas a un potencial de -60 mV.

Registros de fijación de voltaje en célula entera, *patch-clamp whole-cell*: Efecto de las MTs sobre la LTP

Se indujo potenciación de largo término, LTP, en condiciones control, por medio del protocolo de estímulos pareados.

En la figura 12 se pueden observar las amplitudes de las corrientes evocadas, normalizadas con respecto al promedio de la amplitud basal (círculos negros). La estimulación administrada produjo un aumento de la amplitud de las corrientes que, durante los primeros 15 minutos, se mantuvo en el doble del nivel basal, y luego se estabilizó en un nivel de alrededor de un 50 % por encima de la transmisión basal, por al menos 40 minutos.

La segunda vía estimulada no recibió estímulos pareados y permaneció sin alteraciones en lo que respecta a la amplitud de las corrientes evocadas, a lo largo de todo el registro (círculos negros, inserto).

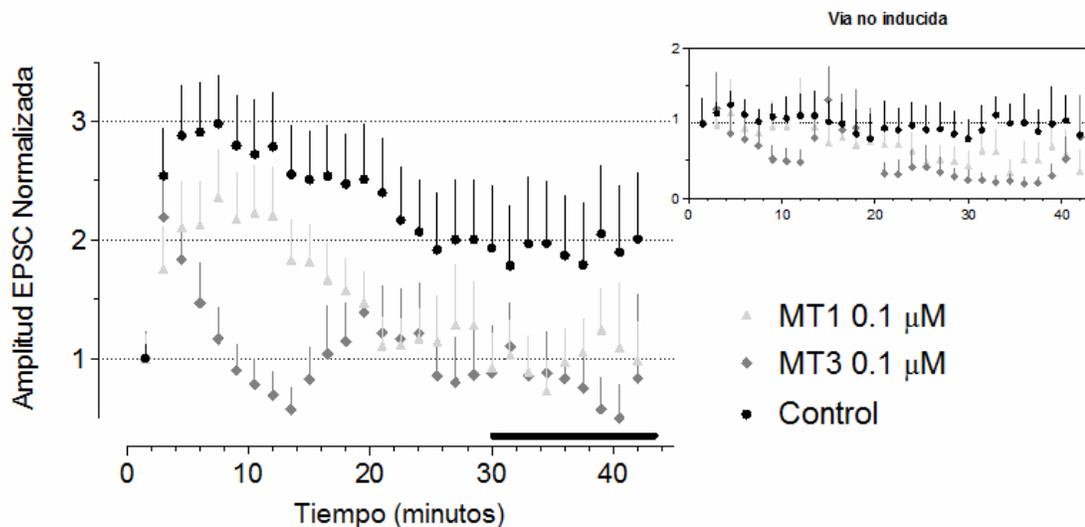


Figura 12 Bloqueo del receptor M4 por MT3 e inhibición de la producción de LTP. La presencia de las toxinas MT1 (▲ n = 5) y MT3 (◆ n = 5) en una concentración igual a 0.1 μM bloqueó la inducción de LTP (● n = 6).

En el inserto se muestran los promedios de las amplitudes de las respuestas evocadas de la vía sináptica que no recibió la estimulación, para cada tratamiento. La barra indica la ventana temporal empleada para el análisis estadístico. Los valores consignados representan medias ± ESM.

El aumento sostenido de la amplitud, en las corrientes de la vía que recibió el protocolo de inducción, y la estabilidad de las corrientes en la vía control, nos permiten concluir que la potenciación conseguida cumple con el criterio para ser considerada LTP.

Con el objetivo de esclarecer el rol de los RACHM en la potenciación, se indujo LTP en presencia de las toxinas muscarínicas.

En la figura 12 se observa el efecto de las toxinas MT1 (triángulos grises) y MT3 (rombos negros), ambas en una concentración de 100 nM, sobre la inducción de la potenciación. La presencia de las toxinas bloqueó la LTP, con diferencias en la cinética de acción: con MT1 se observa que ocurrió un aumento de la amplitud transitorio, que al término de los 15 minutos posteriores a la inducción retornó al nivel basal previo a la inducción. Con MT3, en cambio, se observa que los valores de la amplitud luego de la inducción, permanecieron en el nivel basal durante todo el registro.

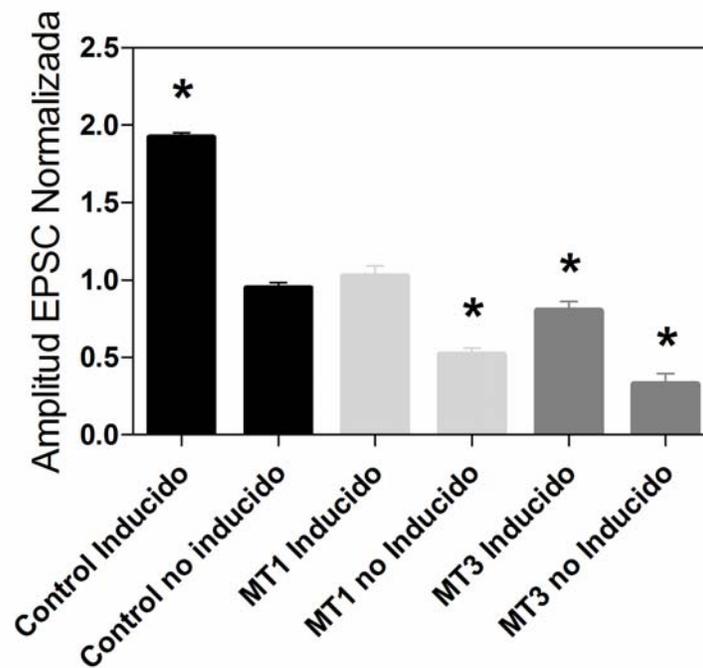


Figura 13 Análisis estadístico de los datos de fig 12. Promedios de las amplitudes de EPSC de los últimos 10 minutos de registro, según indica la barra figura 12. Los asteriscos marcan las medias que resultaron significativamente distintas de 1, al aplicar la prueba t de Student $P < 0.01$. Las medias con sus respectivos ESM resultaron (en el mismo orden que en la figura): 1.92 ± 0.02 , 0.93 ± 0.04 ; 0.74 ± 0.06 , 0.72 ± 0.05 ; 0.88 ± 0.06 , 0.56 ± 0.09

En la figura 13 se muestra el análisis estadístico de los datos de la figura 12; se calculó el promedio de las pendientes en el lapso indicado por la barra de la figura 12 y se analizó mediante la prueba t de Student para detectar diferencias con respecto a 1, del promedio del basal.

En los registros control se alcanzó un promedio de la amplitud normalizada de las corrientes EPSC de 1.92 ± 0.02 (media \pm ESM), correspondiente a la vía que recibió el protocolo de inducción, mientras que en la vía no inducida el promedio de las amplitudes se mantuvo en 0.93 ± 0.04 .

En los registros obtenidos en presencia de MT1 el promedio de las amplitudes EPSC en la vía inducida resultó 0.74 ± 0.06 y en la vía no inducida, 0.72 ± 0.05 ; en los registros con MT3 los respectivos promedios resultaron 0.88 ± 0.06 (vía inducida) y 0.56 ± 0.09 (vía no inducida).

A partir de estos resultados podemos inferir que el bloqueo del receptor M4, tanto por MT1 como por MT3, impidió la inducción de la LTP. También es interesante notar que, en presencia de ambas toxinas, se produjo una inhibición de la transmisión que alcanzó valores estadísticamente significativos pasados los 20 minutos de registro (vías no inducidas, inserto en fig 12 y fig 13).

Registros de potenciales de campo: rol de los MACHR en la LTP

Se obtuvieron registros de potenciales eléctricos de campo en rodajas de hipocampo, a nivel de las sinapsis de las fibras colaterales de Schaffer con las neuronas piramidales de CA1.

Se indujo LTP por estimulación de alta frecuencia (HFS: 4 trenes de 1 segundo de duración, separados por intervalos de 20 segundos, a 100 Hz, 0.2 milisegundos de duración de cada pulso). Se prosiguieron los registros por al menos otros 40 minutos. Se registraron las respuestas evocadas basales hasta obtener respuestas estables, por lo menos durante 10 minutos, y luego se suministraron las drogas (vehículo, MT3 y escopolamina) por medio de una bomba de presión. Tres minutos después se suministró el protocolo de inducción de la LTP.

En la figura 14 se observan los valores de las pendientes de las respuestas evocadas, normalizadas al promedio de las pendientes basales. Puede observarse claramente que la administración del vehículo (círculos blancos) no interfirió con la LTP: hubo un aumento de los valores de las pendientes que ocurrió inmediatamente luego de la inducción, y que alcanzó alrededor de un 50 % de incremento, que a medida que progresaba el registro siguió aumentando paulatinamente hasta alcanzar un 100 %, al cabo de los 40 minutos.

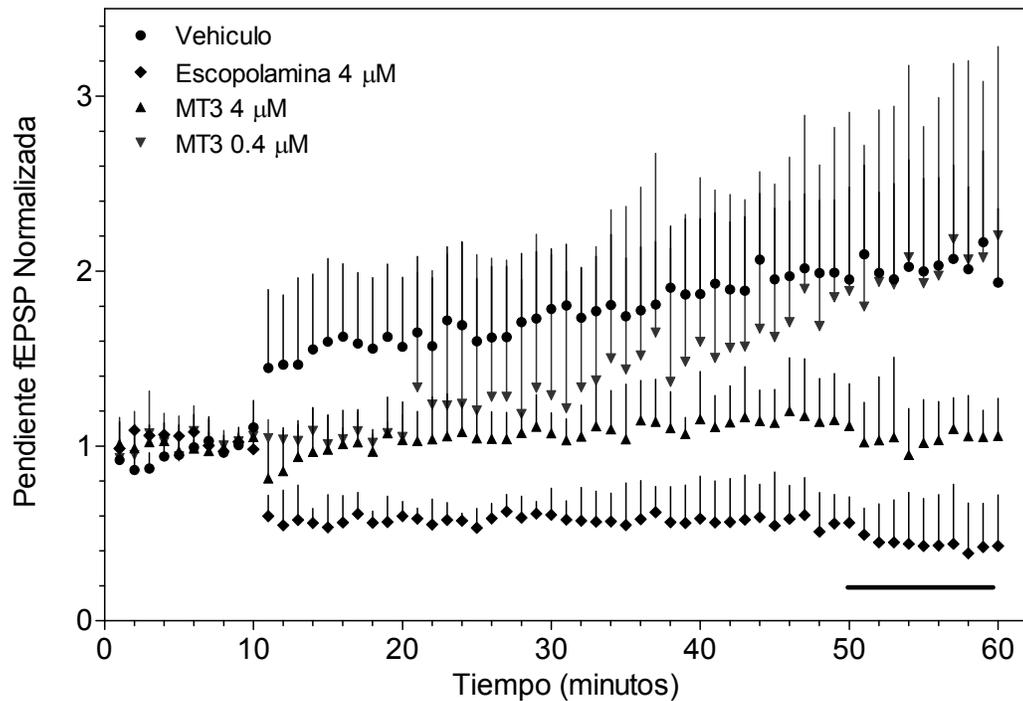


Figura 14 Bloqueo del receptor M4 por MT3 e inhibición de la LTP. La presencia de MT3 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (\blacktriangle n = 5) y escopolamina 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (\blacklozenge n = 5) durante la inducción bloquea la LTP (\bullet n = 6); mientras que MT3 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (\blacktriangledown n = 4) retrasa la aparición de la potenciación. Los valores representan los promedios \pm ESM. La barra indica la ventana temporal establecida para el análisis estadístico

En la misma figura 14 puede observarse que el antagonista muscarínico escopolamina (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, rombos negros) impidió la potenciación. Llamativamente, los valores medidos de las pendientes se mantuvieron estables por debajo del nivel basal, lo que podría atribuirse a un posible efecto inespecífico debido a la elevada concentración de la droga (este puede considerarse un resultado preliminar, ya que sería necesario ver el efecto del antagonista en concentraciones más bajas o, más estrictamente, hacer una curva dosis-respuesta con concentraciones variables del antagonista).

La presencia de MT3 (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, triángulos negros) bloqueó por completo la potenciación, es decir que la pendiente de las respuestas evocadas fue similar antes y después de suministrar el protocolo de inducción. Al disminuir la dosis de MT3 (0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, triángulos grises) se observó un retraso en la potenciación de alrededor de 5 minutos; pasado ese lapso, las pendientes medidas mostraron un incremento gradual y

duradero, hasta alcanzar un nivel de aumento similar al del control, prácticamente al finalizar los registros.

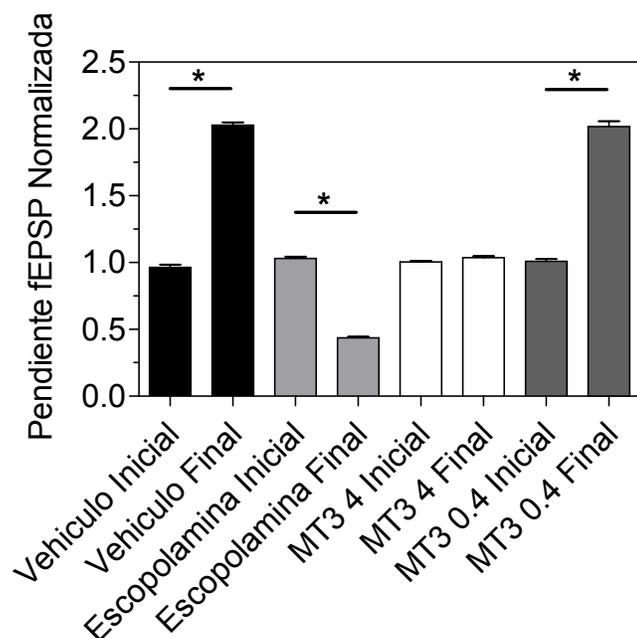


Figura 15 Análisis estadístico de los datos de la fig 14 Promedios de las pendientes de fEPSP de los últimos 10 minutos de registro, según indica la barra de la figura 15, comparados con los promedios de los 10 minutos iniciales.
* Diferencias significativas entre los promedios iniciales y finales, al aplicar la prueba t de Student, $P < 0.01$

En la figura 15 se muestra el análisis estadístico correspondiente a los datos presentados en la figura 14; se compararon los promedios de las pendientes normalizadas en el lapso indicado por la barra de la figura 14 con el respectivo promedio de las pendientes de las respuestas basales de las diferentes condiciones experimentales. En las rodajas tratadas con vehículo se produjo un aumento de las pendientes de 2.03 ± 0.03 (media \pm ESM); la presencia de escopolamina causó una disminución de las pendientes hasta alcanzar el valor de 0.44 ± 0.01 . Con MT3 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ las pendientes se mantuvieron prácticamente sin cambio, 1.04 ± 0.01 , y con MT3 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se registró un aumento de 2.02 ± 0.4 , similar al control.

Funciones cognitivas y sistema colinérgico

Comportamiento

Se realizaron los siguientes ensayos comportamentales con el objetivo de establecer el rol de los receptores M4 en la evocación de la memoria relacionada con un aprendizaje dependiente de hipocampo. En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio ya habíamos probado que los receptores M4 participan en la consolidación.

Campo abierto: Efecto de MT3 pre-test

Las actividades exploratoria y locomotora de los animales en la tarea de campo abierto evaluadas en la sesión de entrenamiento, no fueron alteradas por la administración local de MT3 en el hipocampo antes de esa primera exposición a la arena. Se empleó la dosis de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de MT3 administrada 20 minutos antes de la sesión de prueba, se midieron las elevaciones en las dos patas posteriores (*rearings*) y los cruzamientos de la cuadrícula del piso (*crossings*).

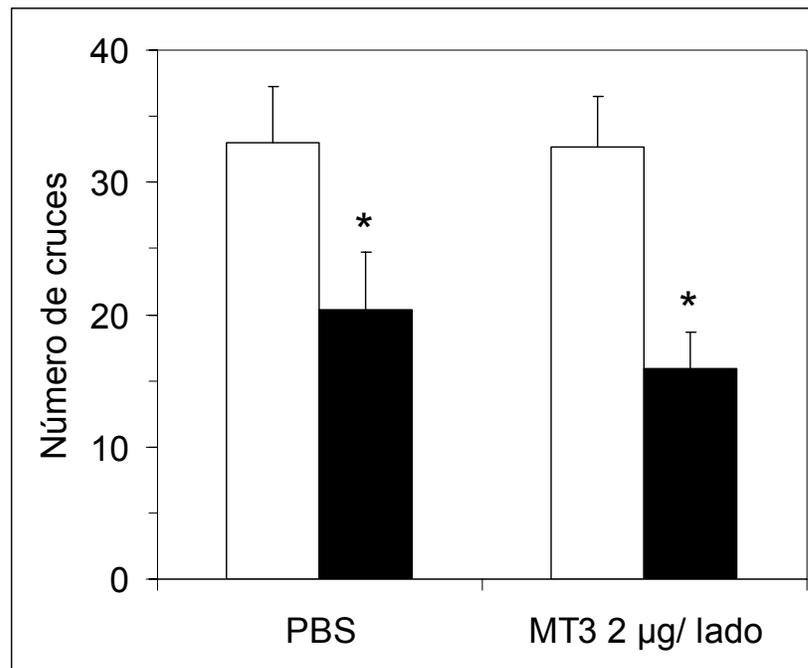


Figura 16 Efecto de la inyección de MT3 previa a la prueba de campo abierto. La cantidad de cruces sobre la grilla del piso de la arena en la sesión de prueba resultó significativamente menor que su correspondiente valor en la sesión de entrenamiento, tanto para el grupo control (PBS, n = 9) como para el tratado (MT3 2 $\mu\text{g}/\text{lado}$, n = 11) se realizaron pruebas t para muestras pareadas ($P < 0.05$). Además, los promedios de ambos grupos en la sesión de prueba no mostraron diferencias en la comparación por el test t de Student ($P > 0.05$). Los valores consignados representan medias \pm ESM.

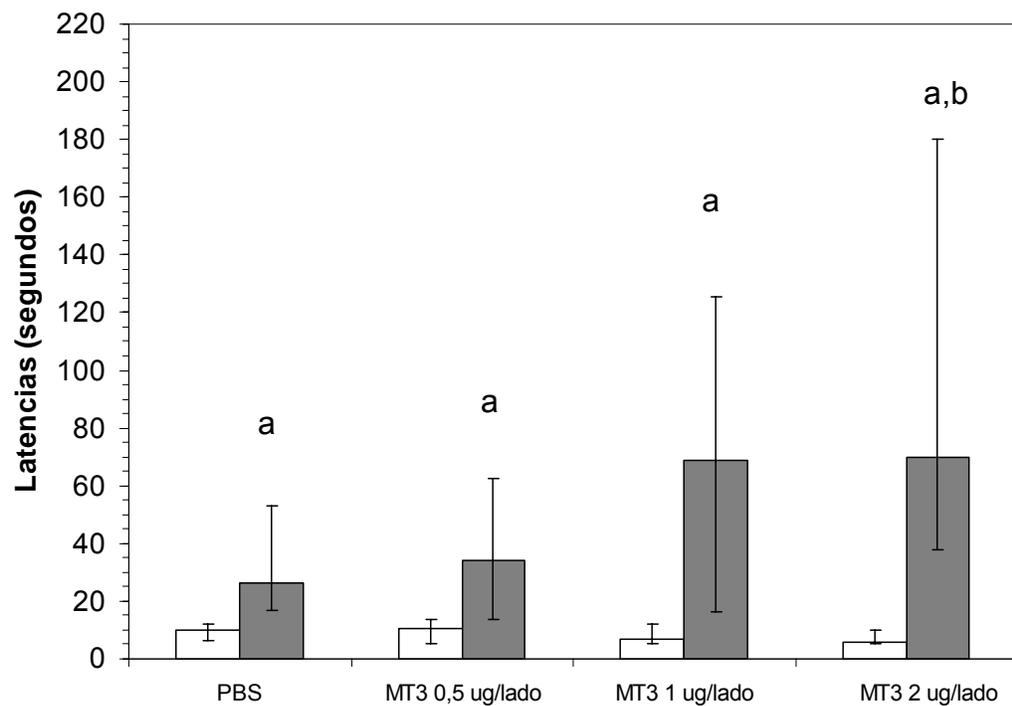
En la figura 16 se observan los valores de las medias de los parámetros medidos en las sesiones de entrenamiento y de prueba, para los grupos de animales tratados con vehículo y con MT3. Las barras blancas indican las mediciones obtenidas durante la sesión de entrenamiento y las barras negras, las de la sesión de prueba.

Para todos los grupos experimentales, los parámetros de exploración y actividad locomotora medidos resultaron menores en la sesión de prueba, con respecto a los correspondientes al entrenamiento.

Se detectaron diferencias significativas en la comparación dentro de los grupos, entre entrenamiento y prueba, lo que indicaría habituación, mientras que no hubo diferencias entre grupos al comparar el desempeño en la sesión de prueba, lo que indicaría ausencia de efecto de MT3 respecto de dichos parámetros.

Evitación inhibitoria: Efecto de MT3 pre-test

Para evaluar el rol de los RChM en la evocación de una memoria, se empleó el paradigma de evitación inhibitoria dado que se obtiene una memoria robusta con una única y rápida sesión de entrenamiento, con lo que se evita la reconsolidación que se produce al repetir varios ensayos de entrenamiento.



Como se refleja en las medianas de las latencias de descenso de la plataforma, la figura 17, los animales inyectados con solución vehículo permanecieron más tiempo sobre la plataforma el día de la prueba, comparado con el día del entrenamiento, lo que significa que alcanzaron el criterio de aprendizaje de la tarea en cuestión.

El grupo de animales tratados con la toxina MT3 mostró un aumento de la latencia en la sesión de prueba, significativamente superior al grupo de los animales control. Queda claro entonces que, en todos los casos, las latencias de la sesión de prueba fueron superiores a las de la sesión de entrenamiento ($P < 0.05$ prueba de Wilcoxon), indicando que todos los grupos de animales alcanzaron el criterio de aprendizaje de la prueba. Pero, como además hubo un aumento significativo en las latencias de prueba para animales tratados con MT3 con respecto a las latencias del grupo control, se podría interpretar que la inyección pre-test de MT3 en el hipocampo dorsal tuvo un efecto facilitatorio. Dicho efecto facilitatorio fue significativo con la dosis más alta de MT3 ($2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) ($p < 0.05$, por el test de Dunn), mientras que con las dosis menores (0.5 y $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) sólo se manifestó una tendencia de las latencias de prueba a aumentar, que fue consistente, aunque dicho aumento no resultó estadísticamente significativo (fig 17).

Los receptores M4, en consecuencia, parecen intervenir en el proceso de evocación y, como su bloqueo mejora el desempeño en esta tarea, es posible afirmar que tendrían un rol inhibitorio sobre la evocación.

Es interesante notar que, en trabajos anteriores, demostramos que la inyección intra-hipocampo de MT3, inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, provocó amnesia (Romanelli-Ferreira y col., 2003); es decir que el efecto del bloqueo de los receptores M4 sobre la memoria sería opuesto según se produjera después del entrenamiento o antes de la prueba. En otras palabras, la función de dichos RACHM sería diferente durante la consolidación y durante la evocación.

Discusión

Ensayos de unión de ligando

El principal objetivo de los experimentos de desplazamiento de la unión de un radioligando muscarínico específico por las toxinas, consistió en estimar la proporción de los subtipos de RACHM en las estructuras estudiadas.

Las afinidades de las MTs utilizadas y las concentraciones empleadas habrían determinado que la marca fuera desplazada principalmente de los sitios M1 y M4, y que el radioligando fijado a los demás receptores muscarínicos permaneciera unido dada la despreciable afinidad de las MTs por ellos.

Con MT1, que presenta afinidades muy similares para ambos receptores M1 y M4, los datos se ajustaron a modelos de un sitio, mientras que con MT3 el mejor ajuste se obtuvo a un modelo de dos sitios, dado que a bajas concentraciones la toxina escarica exclusivamente interaccionando con los sitios M4 y, a medida que se aumenta su concentración, empezaría a reclutar los sitios M1; por consiguiente, el total de desplazamiento alcanzado indicaría la suma de los receptores M1 y M4.

Los resultados obtenidos indican que, en hipocampo, cerca de un 80 % de sitios muscarínicos se corresponde con el total de M1 y M4, de los cuales un 25 % serían M4 (fig 1A y tabla 1 resultados). En cambio, en estriado M1 y M4 representan alrededor de un 90 % del total y M4, llegaría al 30 % (fig 1B y tabla 1 resultados). En amígdala, la suma de M1 más M4 reflejan un 60 % del total y M4 solamente representaría un 10 % (fig 1C y tabla 1 resultados).

No se puede sin embargo descartar que exista una sobre-estimación de la sumatoria de los subtipos de receptores, ya que en las concentraciones más altas, la MT3 podría también estar desplazando la marca radiactiva del subtipo M3, aunque según otros autores y otras técnicas, este receptor se encontraría en mucho más bajas concentraciones en el cerebro, que los subtipos M1 y M4.

Estimaciones similares fueron obtenidas por otros métodos, especialmente e por inmunohistoquímica y utilizando ligandos poco selectivos: Levey y col. (1991) reportaron que en hipocampo se expresarían en cantidades similares los subtipos M1, M2 y M4 (Levey y col., 1991); en estriado se considera al M4 como al más abundante junto con M1 (Yan y col., 2001; Flynn y col., 1995; Hersch y col., 1994); en amígdala se expresaría mayoritariamente M1 y en menor medida M2 y M4 (Levey y col., 1991, 1995).

Entonces nuestros resultados coinciden en parte con los reportes de la bibliografía, pero se modifican sustancialmente las proporciones relativas: ya que tanto en hipocampo como en estriado, el subtipo M1 sería prevalente en las ratas adultas, con una contribución muy importante del M4, mientras que en la amígdala la concentración de RACHM es mucho menor, y la contribución de M4 resultaría muy pobre.

Regulación de los niveles de AMPc

Se detectaron diferencias en los niveles de síntesis basal de AMPc en las tres estructuras estudiadas y en la sensibilidad a FSK.

La síntesis basal de AMPc es mayor en estriado, seguida por la de hipocampo y es aun mucho más baja en amígdala (tabla 2, resultados). Además, la respuesta a la estimulación por FSK es diferente en cada estructura; cuando se refirió como porcentaje, la producción de AMPc estimulada respecto a los niveles basales, (fig 2 y tabla 2, resultados), se puso en evidencia que en estriado la estimulación produjo un aumento de la síntesis de AMPc que fue el doble del aumento que se obtuvo en hipocampo; a su vez, la estimulación en amígdala produjo un incremento relativo comparable al de hipocampo.

Se puede interpretar que la sensibilidad a FSK es diferente en cada una de dichas estructuras, posiblemente debido a que varía notablemente la expresión de isoformas de AC, en cuanto al tipo y localización; ello explicaría las variaciones en la actividad basal y en la sensibilidad a FSK.

El agonista muscarínico oxotremorina produjo una inhibición de la síntesis de AMPc estimulada por FSK, que resultó en una curva bifásica en hipocampo (fig. 3 resultados) y estriado (fig. 4 resultados). Por su parte, los tres agonistas muscarínicos (oxotremorina, carbacol y pilocarpina) produjeron una inhibición monofásica en amígdala (fig. 7 resultados).

El agregado del antagonista escopolamina en el hipocampo revirtió las inhibiciones de alta afinidad del agonista, sin afectar las de baja afinidad.

En hipocampo, la inhibición de alta afinidad redujo en aproximadamente un 20 % la actividad de AC estimulada con 100 μ M FSK. El hecho de que dicha inhibición

resultara bloqueada por escopolamina permite concluir que se trata de una inhibición muscarínica específica.

Por otra parte, la inhibición de baja afinidad se mantuvo sin cambio significativo, en presencia del antagonista escopolamina (100 μM), lo que sugiere fuertemente que esa inhibición se debería a un efecto inespecífico del agonista, atribuible a que, a las concentraciones elevadas en que se encontraba, podría estar actuando, por ejemplo, sobre sitios no muscarínicos.

Las tres toxinas muscarínicas reprodujeron el efecto del antagonista específico pleno, no selectivo por subtipos de receptores, revirtiendo la inhibición considerada muscarínica y recuperando así la síntesis de AMPc correspondiente a una estimulación con FSK 100 μM .

Con MT1 y MT3 se observó una curva similar a la obtenida con escopolamina, mientras que con MT2 la curva correspondiente estuvo desplazada hacia la derecha, la región de mayor concentración del agonista; ello podría deberse a la menor afinidad por los RACHM que presenta MT2, que también es selectiva para M1 y M4, en comparación con las otras MTs utilizadas.

Por otra parte, la baja afinidad, en algunos casos despreciable, de las MTs por los receptores M2, M3 y M5 (Introducción, fig 2), y el hecho de que el receptor M1 en general no acopla a la vía de la AC, permiten sugerir fuertemente que la mayor parte del control muscarínico de la actividad de AC en el hipocampo estaría relacionado con el receptor M4.

El comportamiento obtenido en estriado fue similar, aunque la estimulación de AC alcanzada fue notablemente mayor; sin embargo, la modulación muscarínica detectada correspondió a una fracción menor, resultando muy difícil de establecer. Estos resultados sugieren que la proporción de receptores M2 y M4 ligados a AC en esta estructura, sería menor en comparación con la fracción de receptores correspondiente en el hipocampo. Por otro lado, los resultados obtenidos en amígdala indican que no habría modulación muscarínica detectable de la actividad de AC en esta estructura.

Otra conclusión importante que se desprende de estos datos es el perfil farmacológico de las MTs frente al receptor M4: las tres toxinas actuaron como antagonistas, es decir que su unión al receptor podría bloquear la interacción con la proteína G_i , de manera similar a la escopolamina. Además, ni MT1 ni MT3 tuvieron efecto *per se* en ausencia del agonista sobre la actividad de AC estimulada con FSK (fig

5 resultados); tampoco se detectó modulación de AC en condiciones basales para un amplio rango de concentraciones de MT3; recién al superar la concentración de 25 μM de la toxina empieza a evidenciarse una inhibición de la síntesis de AMPc (fig 6 resultados), lo que interpretamos se debería a un efecto inespecífico. Por lo tanto, en todos los demás experimentos realizados, como nunca se superó una concentración de 10 μM de las toxinas, podemos asumir que las MTs estarían actuando como antagonistas M4 exclusivamente (en el caso de MT3) y como antagonista M4 y posiblemente agonista M1 (en el caso de MT1).

Estos resultados permitieron corroborar que habría mucha más AC que la susceptible de ser modulada por los RACHM y, por lo tanto, sólo una fracción minoritaria de la enzima sería regulable por ellos.

La AC ha sido propuesta como un detector molecular de coincidencia neuronal debido a que sobre ella pueden converger diferentes neurotransmisores, a través de una gran variedad de receptores y, además, desde el medio intracelular puede ser modulada por proteína-quinzasas (PKA y PKC fundamentalmente) y por el segundo mensajero Ca^{2+} .

En base a nuestros resultados es posible interpretar que, de las diferentes isoformas de AC que se expresan simultáneamente en una neurona, sólo alguna/s podría/n estar cumpliendo el rol de detector de coincidencia en relación con la transmisión colinérgica. Serían justamente estas formas las que estarían acopladas a la señalización por RACHM. Los resultados obtenidos con dopamina, que se comentan más adelante, refuerzan esta interpretación.

La estimulación de la AC por dopamina fue mucho menor que la obtenida con FSK (fig 8 resultados), como era de esperar, puesto que en lugar de actuar directamente sobre la enzima, el neurotransmisor debe unirse a su receptor y modular a la AC con la mediación de la proteína G. Además, también debe tenerse en cuenta que los receptores dopaminérgicos no acoplarían a todas las formas de AC, en cualquier localización.

De los diferentes subtipos de receptores dopaminérgicos, los D1/5 acoplan a Gs, mientras que los D2/3/4 lo hacen a Gi: o sea que la resultante de estas acciones

antagónicas depende fundamentalmente de los diferentes subtipos de receptores presentes y de su localización con respecto a las proteínas G y AC.

La estimulación neta de la síntesis de AMPc por dopamina en hipocampo y estriado indica que en estas estructuras prevalecen los receptores del tipo excitatorio en lo que respecta a la AC.

La pobre estimulación dopaminérgica obtenida en hipocampo planteó un escaso margen de acción para analizar la modulación muscarínica; en consecuencia, se decidió seguir investigando la modulación dopaminérgica en estriado donde, por un lado el balance entre la transmisión dopaminérgica y colinérgica sería relevante fisiológicamente y, por el otro, los datos obtenidos posibilitaban su estudio con la metodología empleada (Albin y col., 1989; Lehmann y Langer, 1983; Hornykiewicz, 1973). Por estos motivos, los restantes experimentos se realizaron con membranas de estriado, en las que la estimulación de AC por dopamina fue más robusta.

El agonista muscarínico oxotremorina inhibió la síntesis de AMPc de forma más notoria y completa en el caso de la estimulación por dopamina, que en el caso de la estimulación con FSK, llevando la inhibición hasta el 40 % aproximadamente (fig 9 resultados). Estos resultados muestran que, en condiciones más relacionadas a las fisiológicas, el juego de estimulación e inhibición por parte de los diferentes neurotransmisores, daría cuenta de la mayor parte de la actividad de AC.

La completa recuperación de la inhibición muscarínica de la síntesis de AMPc gracias a la MT3, permite atribuir el efecto muscarínico sobre la AC de estriado y de hipocampo, en su totalidad o en la mayor parte, al subtipo de receptor M4 (fig 9 resultados).

Estos resultados no concuerdan con otros reportes en donde se propone que la regulación de AC en estriado es ejercida conjuntamente por los receptores M2 y M4 (Olianas y col., 1998).

Sin embargo, un estudio reciente (Yan y col., 2001) demuestra que la mayoría de las neuronas espinosas de estriado expresan el subtipo M4, además del M1, conjuntamente con el receptor D1; más aun, estos investigadores no pudieron detectar la expresión del subtipo M2. Teniendo en cuenta que ese tipo neuronal es el mayoritario en esta estructura, parece posible que nuestros resultados estuvieran reflejando la regulación de los niveles de AMPc en neuronas espinosas.

Se ha estudiado el rol del AMPc en la transmisión sináptica mediante el empleo de activadores de la actividad de AC (forskolina) e inhibidores de las fosfodiesterasas (IBMX), que son las enzimas que degradan el AMPc, terminando la señal. El aumento de los niveles de AMPc potencia la transmisión sináptica; sin embargo, no hay acuerdo sobre el sitio de acción de este segundo mensajero: para algunos, autores el efecto es presináptico y aumenta la liberación del neurotransmisor; presumiblemente regula la liberación del glutamato (Chávez-Noriega y Stevens, 1994; Kaneko y Takahashi, 2004); mientras que para otros es más importante el efecto a nivel postsináptico, donde modularía la excitabilidad de la membrana (Sokolova y col., 2006).

El protocolo empleado para la preparación de membranas sinaptosomales lleva a un enriquecimiento en membranas presinápticas, por lo tanto es posible suponer que los fenómenos observados se corresponderían predominantemente a lo que ocurre en el terminal axónico, en cuanto a modulación de la señalización por AMPc. Sin embargo, debe también tenerse en cuenta que las membranas postsinápticas serían más ricas en receptores y, posiblemente, en algunas de las proteínas relacionadas.

En animales KO para el receptor M4 se demostró que, en estriado, es este subtipo el que controla la liberación de acetilcolina (Seeger y col., 2003); debido a su localización presináptica es razonable suponer que también podría regular la liberación de otros NT como los aminoácidos excitatorios (Rouse y col., 1998); por lo tanto, sería factible que el AMPc participara del mecanismo bioquímico involucrado, como se puede sugerir de los trabajos de marcación con anticuerpos.

El efecto facilitatorio del AMPc sobre la liberación de neurotransmisores podría ocurrir ya sea afectando los mecanismos que regulan la disponibilidad de Ca^{2+} en el terminal, o actuando sobre la secuencia de eventos que conduce a la exocitosis. Se ha demostrado que el AMPc aumenta las corrientes a través de canales de Ca^{2+} de umbral elevado, que son canales dependientes de voltaje (Chetkovich y col., 1991), así como suprime una conductancia lenta de K^+ activada por Ca^{2+} (I_{AHP}) en neuronas piramidales de CA1 (Madison y Nicoll, 1982). La presencia de una o de ambas corrientes en los terminales de las neuronas de CA3, podría potenciar el ingreso de Ca^{2+} por despolarización y así llevar a la liberación de neurotransmisor.

Un mecanismo alternativo, no excluyente con el anterior, podría ser mediado por PKA que, a su vez, fosforila diferentes proteínas. Por ejemplo, son sus sustratos la synapsina I, proteína asociada a la vesícula sináptica que controla la liberación de neurotransmisores (Llinás y col., 1985; Browning y col., 1990) y la SVAPP-120 (*vesicle-associated phosphoprotein*), también relacionada a la fusión de las vesículas sináptica (Greengard y col., 1993).

Por otra parte, cabe preguntarse ¿cuáles transmisores/moduladores endógenos, fuera de la ACh, pueden regular el AMPc intracelular?

Los receptores metabotrópicos de glutamato mGluR2/3/4 modulan la actividad de AC (Tanabe y col., 1992; Schoep y Conn, 1993). Además, la activación de estos receptores deprime la transmisión excitatoria en la zona CA1, por un mecanismo presináptico, aunque no ha sido reconocido aun el segundo mensajero involucrado (Baskys y Malenka, 1991).

Los receptores de adenosina están tónicamente activados en rodajas de hipocampo (Dunwiddie y Hoffer, 1980), se acoplan a AC (Fredholm y col., 1983) y su activación en la presinapsis inhibe potentemente la transmisión excitatoria en hipocampo (Prince y Stevens, 1992; Thompson y col., 1992); es posible que este efecto sea mediado por el receptor A1 que inhibe a la AC.

Los receptores GABA_B también pueden acoplarse negativamente a la AC (Hill, 1985; Bowery y col., 1990) y se ha demostrado que pueden inhibir presinápticamente la liberación de neurotransmisor en sinapsis excitatorias de hipocampo (Scanziani y col., 1992).

Por otro lado, los receptores β -adrenérgicos, H2 de histamina, D1 de dopamina y receptores para VIP son todos capaces de activar AC (Dolphin y col., 1979; Segal y col., 1981; Etgen y Browning, 1983) y, en conjunto, la interacción entre ellos, así como con otros moduladores endógenos, contribuiría al mantenimiento de los niveles de AMPc en los terminales presinápticos y, por lo tanto, podría influir sobre la eficacia de las sinapsis excitatorias.

Con nuestros experimentos se demuestra que la transmisión colinérgica y la dopaminérgica pueden converger sobre la modulación de la AC, la primera principalmente mediante el receptor M4 y la segunda, posiblemente a través de D1; así esos neurotransmisores regularían los niveles de AMPc en estriado. Como lo más

probable es que este fenómeno ocurra en la presinápsis, este mecanismo podría estar involucrado en el control de la liberación del neurotransmisor.

Mediante el empleo de animales KO se propuso que, en hipocampo, sería el subtipo M2 el principal autorreceptor inhibitorio que regula la liberación de ACh, mientras que el receptor M4 cumpliría un rol equivalente en estriado, además de promover la liberación de dopamina (Zhang y col., 2002a y 2002b). Sin embargo, en nuestros experimentos no detectamos acción alguna del receptor M2 sobre la AC, ya que el bloqueo selectivo del receptor M4 por MT3 restituyó los niveles de síntesis de AMPc al valor control, tanto en estriado como en hipocampo.

En este escenario sería posible que el receptor M4 pudiera, no solamente estar relacionado con el control de la liberación del NT excitatorio, sino también con el control de la liberación de NT inhibitorios como GABA. A su vez, no puede descartarse que el mismo receptor se sitúe conspicuamente en la membrana postsináptica y tenga que ver con la regulación de la excitabilidad de las neuronas de CA1, por ese o por otros mecanismos.

Uno de los principales blancos del AMPc es la proteína quinasa PKA, que junto a otras quinasas tiene un rol fundamental en LTP (ver Soderlig y Derkach 2000). además, la PKA, como consecuencia de estimulación repetida, puede resultar translocada al núcleo, donde ejercería efectos de reprogramación genética (Bacskai y col., 1993); por este motivo también se considera una molécula clave en la consolidación de la memoria. Numerosos trabajos dan sustento a la hipótesis que vincula la PKA con los procesos de aprendizaje y memoria, tanto en algunas especies de invertebrados como hasta en mamíferos (Romano y col., 2006, 1996; Micheau y Riedel, 1999; Frey y col., 1993; Castelluci y col., 1982). Por lo tanto es posible afirmar que el control de los niveles intracelulares de AMPc sería un factor clave tanto en la regulación de la transmisión sináptica como de los procesos cognitivos relacionados a aprendizaje y memoria.

Electrofisiología

Se ha demostrado ampliamente la participación de los RACHM en la regulación de la transmisión glutamatérgica, incluyendo la supresión de la transmisión en las sinapsis de las colaterales de Schaffer en el hipocampo, por un mecanismo presináptico (Fernandez de Sevilla y Buño, 2003, Rasmusson, 2000, Hasselmo, 1999; Kimura y Baughman, 1997; Levey, 1996; Valentino y Dingleline, 1981; Hounsgaard, 1978). También se han demostrado efectos similares en diversas áreas del cerebro: los agonistas muscarínicos deprimen las corrientes mediadas por receptores AMPA en motoneuronas del hipogloso (Bellingham y Berger, 1996), mesencéfalo (Grillner y col., 1999), amígdala (Yajeya y col., 2000), telencéfalo basal (Sim y Griffith, 1996), estriado (Hsu y col., 1995), corteza visual (Kimura y Baughman, 1997) y corteza auditiva (Metherate y Ashe, 1991).

Ha sido sugerido, en base a evidencia farmacológica, que en esta supresión estarían involucrados los receptores M1 y M2 (Dutar y Nicoll, 1988a; Sheridan y Sutor, 1990; Kremin y col., 2005). Estos efectos presinápticos no serían incompatibles con efectos postsinápticos que causan aumento de la excitabilidad de las células piramidales de CA1 (Rouse y col., 1999); se ha sugerido que dicho aumento de excitabilidad estaría mediado por M1.

Auerbach y Segal (1996) demostraron que diferentes concentraciones del agonista CCh (en concentraciones específicas para los RACHM) produjeron efectos contrapuestos sobre la transmisión basal en hipocampo: de manera que a bajas concentraciones el CCh estimula y a concentraciones más altas inhibe, dicha transmisión. La interpretación más simple de estos resultados es que intervienen diferentes subtipos de RACHM, produciendo correspondientes efectos opuestos.

La toxina MT3 en concentraciones inferiores al rango micromolar, no se une a otro receptor muscarínico fuera del M4, como se puede deducir de las curvas de inhibición de la fijación específica de escopolamina tritiada en receptores clonados (fig 2 introducción). Por lo tanto, el efecto de inhibición de MT3 (100 nM) sobre la transmisión evocada basal puede atribuirse por entero al receptor M4 (fig 11 resultados).

Si consideramos el carácter antagonista de la toxina, podemos sugerir que el receptor M4 sería un modulador positivo, tónico, de la actividad eléctrica de las neuronas piramidales de CA1.

Esto último plantea dos cuestiones: la localización del receptor y el mecanismo bioquímico involucrado. Debido a la presencia de picrotoxina (100 μ M) durante los registros, es posible descartar que el efecto observado sea consecuencia de algún tipo de acción sobre la transmisión GABAérgica ionotrópica. Además, si se tiene en cuenta que en el ratón KO para el receptor M4 (Seeger y col., 2003), no pareció estar afectada la liberación de acetilcolina en hipocampo; por lo tanto se atribuyó, este control al receptor M2; como consecuencia, se podría excluir la posibilidad de que el M4 esté actuando como autorreceptor. Aunque no puede descartarse que en el animal KO un subtipo de receptor pueda tomar el comando de una función que en el animal salvaje se realiza por otro subtipo, de acuerdo a los experimentos de inmunomarcación ha sido propuesto que el receptor M4 estaría localizado a ambos lados de la sinapsis (Rouse y col., 1998). Entonces queda abierta la posibilidad de que dicho receptor sea capaz de afectar la transmisión excitatoria al bloquear la inhibición de la liberación de ACh.

La cinética del efecto inhibitorio sobre las corrientes evocadas, promovido por MT3, lleva a suponer como más factible una localización postsináptica del receptor M4, probablemente perisináptica, en la vecindad de las espinas o en alguna otra región de la arborización dendrítica, de forma análoga a lo que proponen Wang y col. (2006) para el receptor M1 en estriado, en LTD: M1 interviene en la transmisión basal y su bloqueo la inhibe en un 40 %, y también interviene en la LTD de las neuronas espinosas, modulando un canal de calcio (Cav1.3) en la espina de la sinapsis glutamatérgica.

Por el hecho de que los registros de fijación de voltaje en célula entera se efectuaron fijando el potencial de membrana en -60 mV, se puede asumir que a lo largo de todo el experimento el receptor NMDA se mantuvo inactivo. En consecuencia, la inhibición de la transmisión producida al bloquear el receptor M4 puede ser atribuida a un desbalance del estado de fosforilación de algún otro canal iónico (muy probablemente del receptor de glutamato AMPA) (Barría y col., 1997).

En los experimentos en los que se empleó MT1 se obtuvo un resultado opuesto al producido por MT3, es decir que se hizo evidente una facilitación de la transmisión basal. A una concentración de 100 nM, la toxina MT1 puede unirse tanto a los receptores M1 como a los M4; mientras que su interacción con el receptor M1 es de tipo agonista (ver tabla 1 Introducción; Kornisiuk y col., 1995), sobre el receptor M4 actúa

como antagonista. El efecto del bloqueo del receptor M4 podría quedar enmascarado por la activación del subtipo M1, si se asume que el M1 promueve una facilitación de la transmisión sináptica como proponen Wang y col. (2006). Mediante el empleo de MT1 48 nM, la mitad de la concentración usada en en estos experimentos, Perez-Rosello y col. (1995), también corroboraron una acción agonista de la toxina en registros de neuronas espinosas de estriado.

En un futuro se podría ensayar con la toxina MT7, el antagonista más selectivo por el receptor M1 que se conoce para investigar si el subtipo M1 también contribuye a esta modulación. Si se produjera una inhibición de la transmisión evocada basal similar a la producida con MT3, y si los efectos de ambas toxinas resultaran aditivos, sería indicativo de que el receptor M1 también contribuye a dicha facilitación.

Además sería necesario poder discriminar si estos fenómenos ocurren en la membrana pre o postsináptica; el estudio de la facilitación por pulsos pareados podría contribuir en este sentido.

Potenciación de larga duración

Diferentes publicaciones demuestran la participación de los RACHM en la LTP de hipocampo; está demostrada la capacidad de modulación que ejercen sobre la potenciación de la transmisión sináptica (Auerbach y Segal, 1996, Shinoe y col., 2005). Por ejemplo, hay publicaciones donde se reportó que el bloqueo no selectivo de los RACHM por escopolamina bloquea la LTP (Yi-Wen y col., 2004; Ye y col., 2001). Sin embargo, otro antagonista muscarínico clásico, la atropina, más de un reporte indica que no se afectó la LTP (Yun y col., 2000; Sokolov y Kleschevnikov, 1995); ello podría deberse por ejemplo, a la diferente cinética de unión de los distintos antagonistas clásicos, en general poco o nada selectivos, a los diferentes subtipos de RACHM.

Wang y col. (2006) demostraron que la disminución funcional del receptor M1 impide la LTD de las células espinosas de estriado. Por otra parte, por lo observado en animales KO para el subtipo M1, parece que dicho receptor no sería necesario para la LTP, aunque podría tener un rol modulador sobre ésta (Anagnostagoras y col., 2003; Shinoe y col., 2005). Entonces resulta clara la necesidad de tratar de dilucidar entre la participación de los subtipos M1 y M4 en la LTP.

Pudimos demostrar que con el bloqueo selectivo del receptor M4 (MT3 100 nM) se evita la potenciación inducida por estímulos pareados (fig 13 resultados). En estos experimentos se expuso la rodaja de cerebro a la toxina desde el inicio del registro, por lo cual, con esos datos, no fue posible discriminar si el bloqueo de LTP por MT3 es una consecuencia indirecta del efecto de la toxina sobre la transmisión basal o si se impide la plasticidad por interrupción de los mecanismos propios de la inducción/expresión. Es posible que por la inhibición de la transmisión basal producida por la toxina no sea factible conseguir la potenciación, porque no se alcanzarían los niveles de actividad necesarios para desencadenar el proceso de plasticidad. Sin embargo, es interesante notar que con la toxina MT1 también se bloquea la LTP, aunque con un desarrollo temporal distinto: con MT3 el bloqueo es inmediato, mientras que con MT1 hay un incremento de la eficiencia sináptica transitorio, que decae al nivel basal en el transcurso de los quince minutos posteriores a la inducción (fig 13 resultados). Esta diferencia notoria puede tener su causa en el hecho de que MT1 se está uniendo simultáneamente al receptor M1 y al M4. Considerando el efecto agonista de MT1 sobre M1, se podría interpretar que la activación del subtipo M1 podría no ser suficiente para hacer posible atravesar el umbral de establecimiento de la LTP, más aún teniendo en cuenta que los receptores M4, que serían necesarios, están siendo bloqueados por la misma toxina.

Por otro lado, nos parece interesante tener en cuenta el efecto que se evidenció sobre la vía que en estos experimentos no recibió el protocolo de inducción de LTP: en el caso del control la amplitud de las corrientes evocadas se mantuvo a lo largo de todo el registro en un nivel estable, cercano al valor previo a la inducción (fig 14 resultados), lo que corrobora la adecuada inducción de la potenciación (ver Barnes, 1995). En cambio, en presencia de las toxinas se produjo una inhibición de la transmisión que al concluir el registro alcanzó significación estadística, tanto con MT1 como con MT3 (fig 14 resultados). Resulta difícil interpretar tal inhibición como similar a la observada en la figura 11 (resultados), dado que en los experimentos de LTP el tejido estuvo expuesto a la toxina el tiempo suficiente como para alcanzar una inhibición estable, tal como la que se observa en la figura 11 y además, esta inhibición apareció más tardíamente.

Es posible que en esta sinapsis haya receptores M4 con ubicaciones y funciones diferentes; se puede interpretar que algunos participarían directamente en el proceso de plasticidad que subyace a la LTP, mientras que otros regularían la excitabilidad de la

neurona postsináptica y/o la liberación de neurotransmisor en la presinápsis. La inducción de la LTP por estímulos pareados implica la fijación del voltaje de la membrana de la neurona postsináptica en 0 mV durante 2 minutos. En esta condición se estarían activando varias cascadas de señalización intracelular, entre las cuales las desencadenadas por la activación del receptor NMDA serían las más relevantes; entonces sería posible que alguna de ellas, en asociación al bloqueo del receptor M4 por las toxinas, determine la inhibición de largo plazo observada en la vía no inducida, como un fenómeno sinérgico.

Los resultados que vinculan al receptor M4 con la LTP fueron corroborados y ampliados en experimentos similares, realizados mediante registros de campo en rodajas agudas de hipocampo de rata, en los que no se bloqueó la transmisión inhibitoria con picrotoxina. En esta preparación, y con un protocolo de inducción de HFS, la exposición transitoria a MT3 (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) durante la fase de inducción bloqueó la LTP.

La selección del modelo experimental empleado respondió básicamente a la intención de representar las condiciones de un modelo de farmacología del comportamiento: nosotros habíamos visto previamente que con una dosis de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de MT3, inyectada inmediatamente después del entrenamiento en el hipocampo dorsal, se inhibía la formación de una memoria de condicionamiento aversivo (Ferreira y col., 2003; Sánchez, 2002). Por lo tanto, los resultados obtenidos permitieron demostrar que la misma concentración de toxina, suministrada durante un período de tiempo y de manera análoga, impidió la producción de LTP. Una dosis inferior de MT3, 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, que no produjo amnesia, tampoco impidió la LTP.

La presencia de escopolamina produjo una inhibición de la transmisión que alcanzo significancia estadística (fig 16 resultados). Es posible que el efecto de este antagonista no selectivo se deba al bloqueo de receptores muscarínicos no M4 (ya que este efecto no aparece con la administración de MT3) y que ocurra mediado por receptores presinápticos, que se puede especular que corresponderían al subtipo M2; o también, que a concentraciones tan elevadas del agonista se provoquen efectos inespecíficos.

Demostramos que el bloqueo de M4 impide la inducción/expresión de LTP, o sea que su participación sería un requisito necesario para el fenómeno de esta forma de plasticidad en la región CA1 del hipocampo.

Es posible que los diferentes protocolos de inducción de LTP activen algunas vías de señalización esenciales compartidas y algunas otras vías modulatorias específicas (Lynch y col., 2007; Lisman, 2003). En los experimentos que realizamos se emplearon dos protocolos de inducción bien distintos y en ambos casos el bloqueo del receptor M4 impidió la LTP: es decir que se puede sugerir que M4 estaría interviniendo en una vía central, esencial (*core*), para la potenciación.

Como además hay abundante evidencia a favor de que semejantes fenómenos de plasticidad sináptica serían el sustrato biológico de las memorias dependientes de dicha estructura y nosotros pudimos demostrar que el bloqueo de M4 en el hipocampo impide la consolidación de una memoria (Ferreira y col., 2003; Jerusalinsky y col., 1998), estamos en condiciones de concluir que la presencia y funcionamiento de este receptor en dicha estructura, son necesarios para la formación de una traza de memoria, así como son necesarios para el desarrollo de la LTP.

Comportamiento

Nuestros resultados en la tarea de campo abierto indican que los receptores M4 de la región dorsal del hipocampo no participarían de las facultades exploratoria y/o motivacional de los animales expuestos a la tarea de campo abierto.

Anteriormente observamos que al bloquear los receptores M4 inmediatamente después del entrenamiento se produjo amnesia (Ferreira y col., 2003; Jerusalinsky y col., 1998).

Por el contrario, el bloqueo de los M4 antes de la sesión de prueba mejora el desempeño en la tarea de evitación inhibitoria. En base a esto, podemos sugerir que estos receptores modularían negativamente el proceso de evocación.

Tomados en conjunto, estos resultados permiten suponer que los procesos de evocación y consolidación no compartirían por completo los mismos sustratos neuronales o, aunque fueran los mismos circuitos los que intervinieran en ambos procesos, estos habrían sido alterados por la experiencia de forma tal que el receptor M4

actuaría como modulador positivo durante la consolidación y como modulador negativo durante la evocación (Szapiro y col., 2002).

Además, en vista de los efectos observados en los ensayos electrofisiológicos, la LTP resultó adecuada como modelo de memoria neuronal en este caso: la toxina MT3 impidió tanto la potenciación de la LTP, como la consolidación de la memoria en el paradigma comportamental empleado.

Conclusiones generales

La interpretación de resultados que presentamos en este trabajo, tomados bajo la perspectiva que surge de la revisión de la literatura pertinente, nos mueve a las siguientes reflexiones de carácter general:

- 1) la actividad de los RAC_hM, así como posiblemente de todos los GPCR, trasciende ampliamente la vía canónica que los vincula a la señalización por segundos mensajeros y es posible encontrar varias acciones en las que estos receptores intervienen en el funcionamiento neuronal sin intervenir en la modulación de los mensajeros intracelulares
- 2) además las cascadas de señalización exhiben un alto grado de entrecruzamiento y aislar la participación específica de determinados subtipos de receptores resulta sumamente dificultoso, condiciones experimentales sutilmente disímiles pueden conducir a evidencias difícilmente reconciliables
- 3) Los GPCR suelen ser entendidos como reguladores tónicos de la actividad neuronal, asumiendo implícitamente una única modalidad de acción y además la amplificación de la señal durante el proceso de transducción. Pero si el grado de activación y amplificación son cercanos a lo que se presume, sería esperable la existencia de mecanismos de autorregulación que controlen la intensidad y duración de la respuesta, como ocurre en la mayoría de los fenómenos biológicos relativos a cualquier nivel de organización. así sería posible que al estimular específicamente determinados GPCR se activen simultáneamente cascadas de señalización cuyos desenlaces sean opuestos.
- 4) Por ejemplo, una publicación reciente muestra como el receptor M1 puede controlar de forma dual el estado de fosforilación del receptor NMDA en

neuronas de hipocampo, y por ende su permeabilidad al Ca^{2+} . Según este trabajo, la activación del M1 produce paralelamente la estimulación de quinasas y fosfatasas que tienen por blanco al receptor NMDA. La prevalencia de una vía sobre otra estaría dada por el nivel de Ca^{2+} citoplasmático (Grishin y col., 2005). Los niveles de Ca^{2+} pueden a su vez reflejar la actividad previa de una neurona y/o modular la actividad de varias proteínas relevantes para su funcionamiento, por lo tanto estos mecanismos duales de regulación pueden llegar a ser extremadamente sensibles.

- 5) El *switch* de una vía a otra podría también explicar los efectos contrapuestos de MT3 al sobre la consolidación y sobre la evocación, indicando que posiblemente los circuitos que se modifican por la experiencia tendrían que ubicarse a nivel molecular mas bien que sináptico

En este trabajo pudimos demostrar la participación del subtipo M4 en un modelo de plasticidad sináptica y el mismo receptor resulto reclutado en el proceso de consolidación de la memoria. Interesantemente, el receptor M4 también tiene un rol el proceso de evocación aunque opuesto al que desempeña en la consolidación. Este resultado no debería resultar sorprendente en vista del análisis que propusimos.

La originalidad de nuestro aporte tal vez resida en que, en cuanto al receptor M4, no ha habido abordajes que se propongan integrar los diferentes niveles de aproximación que presentamos.

- Las toxinas MT1 MT2 y MT3 actúan como antagonistas del receptor M4
- La regulación de AC en hipocampo y estriado es debida principalmente al receptor M4, mientras que en amígdala los RACHM no intervendrían en la vía del AMPc
- El bloqueo selectivo del receptor M4:
 - 1) produce una inhibición de la transmisión glutamatergica en CA1
 - 2) impide la formación de LTP

3) tiene efecto amnésico sobre la consolidación mientras que facilita la evocación

PERSPECTIVAS

- 1) Determinar si el efecto mediado por el receptor M4 es presináptico, postsináptico o mixto
- 2) Probar la participación del receptor M4 en LTD de hipocampo
- 3) Probar la participación del receptor M1 en LTP y LTD de hipocampo empleando la toxina MT7
- 4) Probar la participación de los receptores M1 y M4 en la modulación de la transmisión basal en estriado y en LTP y LTD
- 5) Probar la posibilidad de interacción entre el sistema colinérgico y el dopaminérgico a nivel electrofisiológico en estriado y las consecuencias sobre los fenómenos de plasticidad
- 6) Probar el efecto de MT7 en consolidación y evocación de la tarea de habitación inhibitoria

Bibliografía

- Adem A, Asblom A, Johansson G, Mbugua PM y Karlsson E. Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. *Biochim Biophys Acta* 1988; 968(3): 340-5
- Akerman KE, Enkvist MO y Holopainen I. Activators of protein kinase C and phenylephrine depolarize the astrocyte membrane by reducing the K⁺ permeability. *Neurosci Lett* 1988; 92(3): 265-9
- Albin RL, Young AB y Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989; 12: 366-375
- Amaral DG y Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989; 31(3): 571-591
- Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnama NP, Nathanson NM y Silva AJ. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 2003; 6(1): 51-8
- Arai J y Natsume K. The properties of carbachol-induced beta oscillation in rat hippocampal slices. *Neurosci Res* 2006; 54(2): 95-103
- Artola A y Singer W. Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends Neurosci* 1993; 16(11): 480-7
- Auerbach JM y Segal M. A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1994; 72(4): 2034-40
- Auerbach JM y Segal M. Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol* 1996; 492: 479-93
- Barnes CA. Involvement of LTP in memory: are we “searching under the street light”? *Neuron* 1995; 15: 751-754
- Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC y Soderling DR. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaMK-II during long-term potentiation. *Science* 1997; 276: 2042-2045
- Baskys A y Malenka RC. Agonists at metabotropic glutamate receptors

presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 1991; 444: 687-701

- Bernardo LS y Prince DA. Ionic mechanisms of cholinergic excitation in mammalian hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* 1982; 249(2): 333-44
- Bland BH y Colom LV. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog Neurobiol* 1993; 41(2): 157-208
- Bland BH, Colom LV, Konopacki J y Roth SH. Intracellular records of carbachol-induced theta rhythm in hippocampal slices. *Brain Res* 1988; 447(2): 364-8
- Bliss TV y Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361(6407): 31-9
- Bliss TV y Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232(2): 331-56
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC y Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 1987; 237(4814): 527-32
- Bonner TI, Young AC, Brann MR y Buckley NJ. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1988; 1(5): 403-10
- Bonthius DJ, Lothman EW y Steward O. The role of extracellular ionic changes in upregulating the mRNA for glial fibrillary acidic protein following spreading depression. *Brain Res* 1995; 674(2): 314-28
- Bowery NG, Knott C, Moratalla R y Pratt GD. GABA_B receptors and their heterogeneity. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1990; 46:127-39
- Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson DL y Huntley GW. Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* 2002; 28(1): 245-59
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976; 72: 248-254
- Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K y Buzsaki G. Gamma (40-100

Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 1995; 15: 47-60

- Brown DA y Adams PR. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K^+ current in a vertebrate neuron. *Nature* 1980; 283(5748): 673-6
- Browning MD y Dudek EM. Activators of protein kinase C increase the phosphorylation of the synapsins at sites phosphorylated by cAMP-dependent and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in the rat hippocampal slice. *Synapse* 1992; 10(1): 62-70
- Burwell RD y Amaral DG. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 1998; 398(2): 179-205
- Castellucci VF, Nairn A, Greengard P, Schwartz JH y Kandel ER. Inhibitor of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase blocks presynaptic facilitation in *Aplysia*. *J Neurosci* 1982; 12: 1673-1681
- Cerveñansky C, Engstrom A y Karlsson E. Study of structure-activity relationship of fasciculin by acetylation of amino groups. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1199(1): 1-5
- Chavez-Noriega LE y Stevens CF. Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylate cyclase in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 1994; 14(1): 310-7
- Chavez-Noriega LE y Stevens CF. Modulation of synaptic efficacy in field CA1 of the rat hippocampus by forskolin. *Brain Res* 1992; 574(1-2): 85-92
- Chetkovich DM y Sweatt JD. NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylate cyclase. *J Neurochem* 1993; 61(5): 1933-42
- Chetkovich DM, Gray R, Johnston D y Sweatt JD. N-methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca^{2+} channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(15): 6467-71
- Cole AE y Nicoll RA. Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded in vitro from rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 1984; 352: 173-88
- Colgin LL, Kubota D y Lynch G. Cholinergic plasticity in the hippocampus.

Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(5): 2872-7

- Collingridge GL. The induction of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond* 2003; 358(1432): 635-41
- Dale H. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* 1914; 6: 147-190
- de Weille JR, Schweitz H, Maes P, Tartar A y Lazdunski M. Calciseptine, a peptide isolated from black mamba venom, is a specific blocker of the L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(6): 2437-40
- Dolphin A, Hamont M y Bockaert J. The resolution of dopamine and beta 1 and beta 2 adrenergic-sensitive adenylate cyclase activities in homogenates of cat cerebellum, hippocampus and cerebral cortex. *Brain Res* 1979; 179: 305-317
- Ducancel F, Rowan EG, Cassar E, Harvey AL, Menez A y Boulain JC. Amino acid sequence of a muscarinic toxin deduced from the cDNA nucleotide sequence. *Toxicon* 1991; 29(4-5): 516-20
- Dudek SM y Bear MF. Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J Neurosci* 1993; 13(7): 2910-8
- Dunwiddie TV y Hoffer BJ. Adenine nucleotides and synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 1980; 69(1): 59-68
- Dutar P y Nicoll RA. Classification of muscarinic responses in hippocampus in terms of receptor subtypes and second-messenger systems: electrophysiological studies in vitro. *J Neurosci* 1988; 8(11): 4214-24
- Dutar P y Nicoll RA. Stimulation of phosphatidylinositol (PI) turnover may mediate the muscarinic suppression of the M-current in hippocampal pyramidal cells. *Neurosci Lett* 1988; 85(1): 89-94
- Eccles JC, Schmidt R y Willis WD. Pharmacological studies on presynaptic inhibition. *J Physiol* 1963; 168: 500-30
- Eccles JC. Ionic mechanism of postsynaptic inhibition. *Science* 1964; 145: 1140-7
- Enkvist MO, Holopainen I y Akerman KE. Glutamate receptor-linked changes in

membrane potential and intracellular Ca^{2+} in primary rat astrocytes. *Glia* 1989; 2(6): 397-402

- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Haganir RL y Malinow R. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 2003; 6(2): 136-43
- Etgen AM y Browning ET. Activators of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate accumulation in rat hippocampal slices: action of vasoactive intestinal peptide (VIP). *J Neurosci* 1983; 3(12): 2487-93
- Fernandez de Sevilla D y Buño W. Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation of hippocampal cholinergic afferent fibres. *Eur J Neurosci* 2003 17: 555-558
- Ferreira AR, Furstenau L, Blanco C, Kornisiuk E, Sanchez G, Daroit D, Castro e Silva M, Cerveñansky C, Jerusalinsky D y Quillfeldt JA. Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 74(2): 411-5
- Flynn DD, Ferrari-DiLeo G, Mash DC y Levey AI. Differential regulation of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1995; 64: 1888-1891
- Fredholm BB y Sandberg G. Inhibition by xanthine derivatives of adenosine receptor-stimulated cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat and guinea-pig thymocytes. *Br J Pharmacol* 1983; 80(4): 639-44
- Frey U y Morris RG. Synaptic tagging and long term potentiation. *Nature* 1997; 385: 533-536
- Frey U, Huang YY y Kandel ER. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 1993; 260: 1661-1664
- Frey U, Krug M, Reymann KG y Matthies H. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 1988; 452: 57-65
- Fukunaga K, Muller D y Miyamoto E. CaM kinase II in long-term potentiation. *Neurochem Int* 1996; 28(4): 343-58
- Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ y Benfenati F. Synaptic vesicle

phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 1993; 259(5096): 780-5

- Gustafsson B y Wigstrom H. Hippocampal long-lasting potentiation produced by pairing single volleys and brief conditioning tetani evoked in separate afferents. *J Neurosci* 1986; 6(6): 1575-82
- Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, Shen T, Lipskaya L, Miyamoto N, Suzuki Y y Defer N. Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 128(1-2): 179-194
- Harvey AL. Presynaptic effects of toxins. *Int Rev Neurobiol* 1990; 32: 201-39
- Hebb CO y Konzett H. The effect of certain analgesic drugs on synaptic transmission as observed in the perfused superior cervical ganglion of the cat. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1949; 35(3): 213-7
- Hersch SM, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ y Levey AI. Distribution of m1-m4 muscarinic receptors proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 1994; 14: 3351-3363
- Hill DR. GABA_B receptor modulation of adenylate cyclase activity in rat brain slices. *Br J Pharmacol* 1985; 84(1): 249-57
- Hirotsu I, Hori N, Katsuda N y Ishihara T. Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1989; 482(1): 194-7
- Hoffman DA, Sprengel R y Sakmann B. Molecular dissection of hippocampal theta-burst pairing potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(11): 7740-5
- Hornykiewicz O. Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications. *Br med Bull* 1973; 29: 172-178
- Huang YY, Nguyen PV, Abel T y Kandel ER. Long-lasting forms of synaptic potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn Mem* 1996; 3: 74-85
- Huerta PT y Lisman JE. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* 1995; 15(5): 1053-63
- Huerta PT y Lisman JE. Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. *Nature* 1993; 364: 723-5

- Huerta PT y Lisman JE. Synaptic plasticity during the cholinergic theta-frequency oscillation in vitro. *Hippocampus* 1996; 6(1): 58-61
- Ishikawa y col., 1992
- Iwami y col., 1995
- Jefferys JGR, Traub RD y Whittington MA. Neuronal Networks for Induced “40 Hz” Rhythms. *Trends Neurosci* 1996; 19: 202-208
- Jerusalinsky D, Cerveñansky C, Walz R, Bianchin M e Izquierdo I. A peptide muscarinic toxin from the Green Mamba venom shows agonist-like action in an inhibitory avoidance learning task. *Eur J Pharmacol* 1993; 240(1): 103-5
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Alonso M, Verde ER, Cerveñansky C y Harvey A. Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport* 1998; 9(7): 1407-11
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Ferreira A, Rial VE, Duran R y Cerveñansky C. Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon* 2000; 38(6): 747-61
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Bernabeu R, Izquierdo I y Cerveñansky C. Muscarinic toxins from the venom of Dendroaspis snakes with agonist-like actions. *Toxicon* 1995; 33(4): 389-97
- Jolkkonen M, Adem A, Hellman U, Wernstedt C y Karlsson E. A snake toxin against muscarinic acetylcholine receptors: amino acid sequence, subtype specificity and effect on guinea-pig ileum. *Toxicon* 1995; 33(4): 399-410
- Karlsson E, Risinger C, Jolkkonen M, Wernstedt C y Adem A. Amino acid sequence of a snake venom toxin that binds to the muscarinic acetylcholine receptor. *Toxicon* 1991; 29(4-5): 521-6
- Kawabe y col., 1994
- Kelso SR y Brown TH. Differential conditioning of associative synaptic enhancement in hippocampal brain slices. *Science* 1986; 232(4746): 85-7
- Konopacki J, Bland BH, MacIver MB y Roth SH. Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: independent CA1 and dentate generators. *Brain Res*

1987; 436(2): 217-22

- Konorski J. Changing concepts concerning physiological mechanisms of animal motor behaviour. *Brain* 1962; 85: 277-94
- Kornisiuk E, Jerusalinsky D, Cerveñansky C y Harvey AL. Binding of muscarinic toxins MTx1 and MTx2 from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* to cloned human muscarinic cholinceptors. *Toxicon* 1995; 33(1): 11-8
- Kremin TD Gerber LM Giocomo SY Huang S Tonegawa ME y Hasselmo. Muscarinic suppression in stratum radiatum of CA1 shows dependence on presynaptic M1 receptors and is not dependent on GABA_B receptors. *Neurobiol Learn Mem* 2006; 85(2): 153-63
- Larson J y Lynch G. Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned stimulation involves two events. *Science* 1986; 232(4753): 985-8
- Lehmann J y Langer SZ. The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals? *Neuroscience* 1983; 10: 1105-1120
- Levey AI, Edmunds SM, Hersch SM, Wiley RG y Heilman CJ. Light and electron microscopic study of m2 muscarinic acetylcholine receptor in the basal forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 1995; 351: 339-356
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL y Brann MR. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 1991; 11: 3218-3229
- Liang JS, Carsi-Gabrenas J, Krajewski JL, McCafferty JM, Purkerson SL, Santiago MP, Strauss WL, Valentine HH y Potter LT. Anti-muscarinic toxins from *Dendroaspis angusticeps*. *Toxicon* 1996; 34(11-12): 1257-67
- Linden DJ. The expression of cerebellar LTD in culture is not associated with changes in AMPA-receptor kinetics, agonist affinity, or unitary conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(24): 14066-71
- Ling S, Little PJ, Williams MR, Dai A, Hashimura K, Liu JP, Komesaroff PA y Sudhir K. High glucose abolishes the antiproliferative effect of 17beta-estradiol in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282(4): E746-51

- Lisman J, Malenka RC, Nicoll RA y Malinow R. Learning mechanisms: the case for CaM-KII. *Science* 1997; 276(5321): 2001-2
- Lisman J. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Phil Trans R Soc Lond* 2003; 358(1432): 829-42
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC y Nicoll RA. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(24): 11175-9
- Llinas R, McGuinness TL, Leonard CS, Sugimori M y Greengard P. Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(9): 3035-9
- Loëwi O y Navratil E. Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. Mitteilung X Über das Schicksal des Vagusstoff. *Pflügers Arch. Gesamte Physiol* 1926; 214: 678-688
- Loëwi O. Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. Mitteilung I *Pflügers Arch. Gesamte Physiol* 1921; 189: 239-242
- Lynch G, Rex CS y Gall CM. LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology* 2007; 52(1): 12-23
- MacIntosh FC y Oborin PE. Release of acetylcholine from intact cerebral cortex. *Abstr XIX Int Physiol Congr* 1953; 580-581
- MacVicar BA y Tse FW. Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J Physiol* 1989; 417: 197-212
- Madison DV y Nicoll RA. Noradrenaline blocks accommodation of pyramidal cell discharge in the hippocampus. *Nature* 1982; 299(5884): 636-8
- Makhinson M, Chotiner JK, Watson JB y O'Dell TJ. Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J Neurosci* 1999; 19(7): 2500-10
- Malenka RC, Madison DV y Nicoll RA. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 1986; 321(6066): 175-7

- Malinow R, Schulman H y Tsien RW. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 1989; 245(4920): 862-6
- Markram H y Segal M. Long-lasting facilitation of excitatory postsynaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine. *J Physiol* 1990; 427: 381-93
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chem M, Bailey CH y Kandel ER. Synapse-specific, long-term facilitation of *Aplysia* sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 1998; 91: 927-938
- Max SI, Liang JS y Potter LT. Purification and properties of m1-toxin, a specific antagonist of m1 muscarinic receptors. *J Neurosci* 1993; 13(10): 4293-300
- Micheau J y Riedel G. Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 534-548
- Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A y Wess J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 2001; 21(14): 5239-50
- Mody I y Staley KJ. Cell properties in the epileptic hippocampus. *Hippocampus* 1994; 4(3): 275-280
- Mons N y Cooper DM. Selective expression of one Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase in dopaminergically innervated rat brain regions. *Mol Brain Res* 1994; 22(1-4): 236-44
- Mulkey RM y Malenka RC. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 1992; 9(5): 967-75
- Otmakhov N, Griffith LC y Lisman JE. Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *J Neurosci* 1997; 17(14): 5357-65
- Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, Asrican B y Lisman J. Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J Neurophysiol* 2004; 91(5): 1955-62
- Paxinos G. (1995). *The Rat Brain*. Eds. Paxinos G. Academic Press Inc, San

Diego

- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran J y Capon DJ. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 1988; 334: 434-437
- Perez-Rosello T, Figueroa A, Salgado H, Vilchis C, Tecuapetla F, Guzman JN, Galárraga E y Bargas J. Cholinergic control of firing pattern and neurotransmission in rat neostriatal projection neurons: role of CaV2.1 and CaV2.2 Ca²⁺ channels. *J Neurophysiol* 2005; 93: 2507-2519
- Prince DA y Stevens CF. Adenosine decreases neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(18): 8586-90
- Ramón y Cajal S. (1909). *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Maloine (Reeditado en 1952 por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramón y Cajal, Madrid), Paris
- Rees B y Bilwes A. Three-dimensional structures of neurotoxins and cardiotoxins. *Chem Res Toxicol* 1993; 6(4): 385-406
- Romano A, Delorenzi A, Pedreira ME, Tomsic D y Maldonado H. Acute administration of a cAMP analog and a phosphodiesterase inhibitor improve long-term habituation of the crab *Chasmagnathus*. *Behav Brain Res* 1996; 75: 119–125
- Romano A, Locatelli F, Freudenthal R, Merlo E, Feld M, Ariel P, Lemos D, Federman N y Fustiñana. Lessons From a Crab: Molecular Mechanisms in Different Memory Phases of *Chasmagnathus*. *Biol Bull* 2006; 210: 280–288
- Rouse ST, Gilmore ML y Levey AI. Differential presynaptic and postsynaptic expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptors at the perforant pathway/granule cell synapse. *Neuroscience* 1998; 86: 221-232
- Salamoni SD, Da Costa JC, Palma MS, Konno K, Nihei K, Tavares AA, Abreu DS, Venturin GT, Cunha FB, Oliveira RM y Breda RV. Antiepileptic effect of acylpolyaminetoxin JSTX-3 on rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Brain Res* 2005; 1048 (1–2): 170–176
- Sánchez, 2002, Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA

- Scanziani M, Capogna M, Gähwiler BH y Thompson SM. Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* 1992; 9(5): 919-27
- Schmiedeberg O y Koppe R. (1869) *Das Muscarin. Das giftige Alkaloid des Fliegenpilzes*. Vogel, Leipzig
- Schoepp DD y Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14(1): 13-20
- Seeger T, Fedorova I, Zheng F, Miyakawa T, Koustova E, Gomeza J, Basile AS, Alzheimer C y Wess J. M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J Neurosci* 2004; 24(45): 10117-27
- Segal M. The action of serotonin in the rat hippocampus. *Adv Exp Med Biol* 1981; 133: 375-90
- Segalas I, Roumestand C, Zinn-Justin S, Gilquin B, Menez R, Menez A y Toma F. Solution structure of a green mamba toxin that activates muscarinic acetylcholine receptors, as studied by nuclear magnetic resonance and molecular modeling. *Biochemistry* 1995; 34(4): 1248-60
- Shinoe T, Matsui M, Taketo MM y Manabe T. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 2005; 25(48): 11194-200
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW y Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21: 127-148
- Squire LR y Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(24): 13515-22
- Stoppini L, Buchs PA y Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 1991; 37: 173–182
- Sykova E. Extracellular K⁺ accumulation in the central nervous system. *Prog Biophys Mol Biol* 1983; 42(2-3): 135-89
- Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R y Nakanishi S. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 1992; 8(1): 169-79

- Tanzi E. (1893). I fatti e le induzioni nell'odierna istologia del sistema nervoso. *Revista Sperimentale di Freniatria e di Medicina Legale* 19, 419-472
- Teyler TJ, Cavus I, Coussens C, DiScenna P, Grover L, Lee YP y Little Z. Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 1994; 4(6): 623-34
- Thompson SM, Haas HL y Gahwiler BH. Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 1992; 451: 347-63
- Traub RD y Jefferys JG. Simulations of epileptiform activity in the hippocampal CA3 region in vitro. *Hippocampus* 1994; 4(3): 281-5
- Traub RD y Miles R. Multiple modes of neuronal population activity emerge after modifying specific synapses in a model of the CA3 region of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 627: 277-90
- Van der Zee EA, Compaan JC, Bohus B y Luiten PG. Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptors and colocalized PKC gamma in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. *Hippocampus* 1995; 5(4): 349-62
- Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Rathe J, Waelbroeck M, Jolkkonen M, Oras A y Karlsson E. Purification and sequence determination of a new muscarinic toxin (MT4) from the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *Toxicon* 1995; 33(9): 1171-9
- Venter JC, Fraser CM, Chung FZ, Kerlavage AR, Robinson DA, Gocayne JD y FitzGerald MG. Cloning and expression of adrenergic and muscarinic cholinergic receptor genes. *Adv Exp Med Biol* 1988; 236: 173-80
- Visel A, Alvarez-Bolado G, Thaller C y Eichele G. Comprehensive analysis of the expression patterns of the adenylate cyclase gene family in the developing and adult mouse brain. *J Comp Neurol* 2006; 496: 684-697
- Wigstrom H, Gustafsson B, Huang YY y Abraham WC. Hippocampal long-term potentiation is induced by pairing single afferent volleys with intracellularly injected depolarizing current pulses. *Acta Physiol Scand* 1986; 126(2): 317-9

- Williams JH y Kauer JA. Properties of carbachol-induced oscillatory activity in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1997; 78(5): 2631-40
- Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ y Storm DR. Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 1999; 23(4): 787-98
- Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ y Storm DR. Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 1999; 23(4): 787-98
- Yan Z, Flores-Hernandez J y Surmeier DJ. Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 2001; 103(4): 1017-1024
- Ye L, Qi JS y Qiao JT. Long-term potentiation in hippocampus of rats is enhanced by endogenous acetylcholine in a way that is independent of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci Lett* 2001; 300(3): 145-8
- Yi-Wen L, Hsiu-Wen Y, Ming-Yuan M y Tsai-Hsien C. Heat-shock pretreatment prevents suppression of long-term potentiation induced by scopolamine in rat hippocampal CA1 synapses. *Brain Res* 2004; 999: 222-226
- Ylinen A, Bragin A, Nadasdy Z, Jando G, Szabo I, Sik A y Buzsaki G. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *J Neurosci* 1995; 15: 30-46
- Yun H, Cheong MY, Mook-Jung I, Huh K, Lee CJ y Jung MW. Cholinergic modulation of synaptic transmission and plasticity in entorhinal cortex and hippocampus of the rats. *Neuroscience* 2000; 97(4): 671-676
- Zhang W, Yamada M, Gomeza J, Basile AS y Wess J. Multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes modulate striatal dopamine release, as studied with M1-M5 muscarinic receptor knock-out mice. *J Neurosci* 2002; 22(15): 6347-52
- Jones SV, Barker JL, Bonner TI, Buckley NJ y Brann MR. Electrophysiological characterization of cloned m1 muscarinic receptors expressed in A9 L cells. *Proc Natl*

Acad Sci USA 1988; 85: 4056-4060

- Fukuda K, Higashida H, Kubo T, Maeda A, Akiba I, Bujo H, Mishina M y Numa S. Selective coupling with K^+ currents of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in NG108-15 cells. Nature 1988; 335: 355-358
- Higashida H, Hashii M, Fukuda K, Caulfield MP y Brown DA. Selective coupling of different muscarinic acetylcholine receptors to neuronal calcium currents in DNA-transfected cells. Proc R Soc Lond [Biol] 1990; 242: 68-74
- Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1990; 30: 633-673

Indice

Resumen	- 2 -
Abstract.....	- 4 -
Objetivos.....	- 5 -
Introduccion.....	- 6 -
Presentación.....	- 7 -
Teoría Sináptica de la Memoria.....	- 8 -
Anatomía de la memoria	- 8 -
Reseña histórica de la LTP	- 11 -
Maquinaria bioquímica de la LTP	- 12 -
Breve historia del descubrimiento de la ACh.....	- 15 -
Breve historia de los RACHM	- 16 -
Los caminos de la LTP	- 17 -
RACHM & LTP	- 18 -
RACHM & Excitabilidad de las Neuronas Piramidales de CA1	- 19 -
Actividad neuronal sincronizada	- 20 -
Receptores Muscarínicos.....	- 21 -
Adenilato Ciclasa.....	- 22 -
Toxinas muscarínicas	- 23 -
Objetivos generales.....	- 26 -
Materiales y métodos.....	28
Animales.....	29
Bioquímica	29
Aislamiento de amígdala hipocampo y estriado.....	29
Preparación de membranas sinaptosomales para ensayos de unión específica de radioligandos	30
Fijación específica de radioligandos en membranas sinaptosomales.....	30
Preparación de membranas sinaptosomales para ensayos de actividad AC.....	31
Ensayos de actividad de adenilato-ciclasa.....	31
Análisis de los datos de bioquímica	32
Electrofisiología	34
Registros de campo.....	34
Registros de <i>whole-cell</i>	35
Análisis de los registros de electrofisiología	36
Comportamiento	37
Implantación de cánulas	37
Entrenamiento en una tarea de evitación inhibitoria	37
Entrenamiento en una tarea de campo abierto.....	38
Tratamiento farmacológico.....	38
Análisis de los datos comportamentales.....	39
Toxinas	39
Bioquímica	41
Ensayos de unión específica del radioligando muscarínico ³ H-NMS	42
Con el objetivo de estimar la proporción de los diferentes subtipos de RACHM en tres estructuras de interés para nuestro estudio, se realizaron curvas de desplazamiento del ligando NMS, marcado con tritio, por concentraciones crecientes de las toxinas MT1 y MT3.	42

La figura 1 muestra los resultados obtenidos y los ajustes considerando un modelo de un sitio, para MT1, y de dos sitios para MT3, realizados mediante el programa GraphPad Prism. Los valores obtenidos para los parámetros más relevantes se consignan en la tabla 1.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos y los ajustes considerando un modelo de un sitio, para MT1, y de dos sitios para MT3, realizados mediante el programa GraphPad Prism. Los valores obtenidos para los parámetros más relevantes se consignan en la tabla 1.	42
Actividad Adenilato Ciclasa & Receptores Muscarínicos	43
Estimulación de la AC por forskolina	43
Estimulación de AC por dopamina	53
Efecto del agonista muscarínico en presencia de dopamina 100 μ M	54
Experimentos de electrofisiología	56
Registros de fijación de voltaje en célula entera, <i>patch-clamp whole-cell</i> : Efecto de las MTs sobre la conducción basal	57
Registros de fijación de voltaje en célula entera, <i>patch-clamp whole-cell</i> : Efecto de las MTs sobre la LTP	60
Registros de potenciales de campo: rol de los MACHR en la LTP	63
Funciones cognitivas y sistema colinérgico	66
Campo abierto: Efecto de MT3 pre-test	67
Evitación inhibitoria: Efecto de MT3 pre-test	68
Bibliografía	88
Índice	104