



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**Activación y Modulación Alostérica de
Receptores Nicotínicos $\alpha 7$
Homoméricos y Heteroméricos**

Beatriz Elizabeth Nielsen

Bahía Blanca

Argentina

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**Activación y Modulación Alostérica de
Receptores Nicotínicos $\alpha 7$
Homoméricos y Heteroméricos**

Beatriz Elizabeth Nielsen

Bahía Blanca

Argentina

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../....., mereciendo
la calificación de (.....)

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 08 de septiembre de 2015 y el 18 de noviembre de 2019, bajo la dirección de la Doctora Cecilia Bouzat, Investigadora Superior de CONICET, Directora del INIBIBB y Profesora Adjunta de la Cátedra de Farmacología II.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Sur, por haberme brindado la posibilidad de acceder a mis estudios de grado y posgrado, y al CONICET, por otorgarme los recursos económicos que me permitieron dedicarme por completo al desarrollo de la presente tesis.

A mi directora, Dra. Cecilia Bouzat, por haber confiado en mí y haberme dirigido a lo largo de estos años, brindándome su tiempo, conocimiento y experiencia, y transmitiéndome su perseverancia y entusiasmo por la ciencia. Gracias también por los consejos y las enseñanzas aplicables a todos los ámbitos de la vida.

A todos los integrantes del laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular del INIBIBB, tanto a los actuales como a aquellos ex miembros con los que compartí algunos años al inicio de mi formación. Gracias por su ayuda y apoyo siempre que los necesité a nivel académico y personal.

A los miembros del laboratorio de Farmacología Molecular de Oxford Brookes University, y principalmente a su directora Dra. Isabel Bermúdez, por haberme recibido con tanta calidez durante mi estancia de investigación allí, y por continuar con el asesoramiento y apoyo a la distancia.

A todo el personal del INIBIBB, incluyendo becarios, investigadores y personal de apoyo, quienes de algún modo u otro contribuyeron en este camino.

A mis compañeros de la Cátedra de Fisiología Humana de la Universidad Nacional del Sur, con quienes compartí la actividad docente de forma intercalada con la investigación.

A todos mis amigos, a los que fui conociendo a lo largo de mi vida y que aún permanecen fielmente a mi lado. Gracias por escucharme y por brindarme su apoyo. Gracias por haberme acompañado en mis momentos más difíciles y en aquellos de mayor felicidad.

Por último, lo más importante... a Dios y a mi familia, especialmente a mis padres Aldo y Laura. Les agradezco no sólo por haberme dado la vida, sino también por haberme enseñado a vivirla rodeada de amor, y a construirme como una persona de bien. Fueron, son y serán un ejemplo de lucha, esfuerzo y superación que me llenan de orgullo. Gracias a mi papá, porque su recuerdo vive en mí y me acompaña a cada paso que doy. Gracias a mi mamá, por ser el pilar fundamental de mi vida que me sostiene incondicionalmente.

18 de noviembre de 2019

Beatriz Elizabeth Nielsen

ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN ALOSTÉRICA DE RECEPTORES NICOTÍNICOS $\alpha 7$ HOMOMÉRICOS Y HETEROMÉRICOS

RESUMEN

La **acetilcolina** ejerce un rol preponderante como neuromodulador en el sistema nervioso central, principalmente a nivel de los circuitos neuronales asociados a cognición, memoria, aprendizaje, atención, recompensa y procesamiento de la información sensorial, modificando su respuesta frente a estímulos internos y externos. La señalización colinérgica ocurre tanto por mecanismos de transmisión sináptica como extrasináptica, siendo estos últimos los principales involucrados en la modulación de la excitabilidad neuronal, la liberación presináptica de neurotransmisores, la plasticidad neuronal y la activación coordinada de distintos grupos de neuronas en el encéfalo.

El efecto neuromodulador de la acetilcolina depende no sólo de su sitio de liberación y de la población neuronal blanco, sino también de los receptores a través de los cuales actúa. Por lo tanto, los **receptores nicotínicos** ionotrópicos constituyen una pieza clave en el sistema colinérgico del encéfalo. Estos son canales iónicos pentaméricos activados por ligando que forman parte de la familia de receptores *Cys-loop*. Son permeables a cationes y pueden estar formados por cinco subunidades idénticas o por combinaciones de subunidades diferentes, dando lugar a receptores homoméricos o heteroméricos respectivamente. Cada subtipo de receptor nicotínico presenta una estequiometría definida, es decir, una composición y un arreglo espacial de subunidades particular, responsable de las propiedades biofísicas, farmacológicas y funcionales del canal, que se encuentran íntimamente asociadas a su rol fisiológico diferencial.

Una de las subunidades de receptor nicotínico más abundantes en el sistema nervioso central es **$\alpha 7$** , tradicionalmente reconocida por su capacidad para formar receptores homoméricos de origen evolutivo más ancestral. Sin embargo, evidencias recientes demostraron que también posee la habilidad de coensamblarse con otras subunidades para generar receptores heteroméricos, tales como el novedoso subtipo $\alpha 7\beta 2$. Numerosos desórdenes neurológicos, psiquiátricos, inflamatorios y neurodegenerativos se presentan acompañados de una deficiente señalización colinérgica, por lo que estos receptores nicotínicos conformados por subunidades $\alpha 7$ constituyen un promisorio blanco terapéutico. En el presente trabajo de tesis se descifraron las **bases moleculares de la activación y modulación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos**, utilizando principalmente técnicas electrofisiológicas, con el fin de comprender el impacto diferencial de ambos subtipos en la señalización colinérgica del sistema nervioso central.

El **capítulo I** fue dividido en tres partes y se centró en el estudio de la función molecular del **receptor $\alpha 7$ homomérico** a nivel macroscópico y microscópico. Este receptor exhibe propiedades cinéticas y farmacológicas particulares que lo tornan óptimo en la mediación de procesos de transmisión extrasinápticos, incluyendo su elevada permeabilidad a los iones calcio y su capacidad para transformar respuestas ionotrópicas transitorias en eventos de señalización metabotrópica sostenidos.

En la **parte I** se analizaron los mecanismos moleculares de activación y modulación del receptor $\alpha 7$ homomérico. En presencia de acetilcolina el receptor se activó y desensibilizó con una cinética rápida, evocando mayoritariamente aperturas aisladas breves. Por el contrario, la activación alostérica presentó un mecanismo molecular radicalmente diferente, con un enlentecimiento de la cinética de desensibilización, que permitió la prolongación de las aperturas individuales y su agrupación en episodios de activación sostenidos de muy larga duración. Asimismo, se evaluó la potenciación por compuestos prototipo previamente reportados como moduladores alostéricos positivos (PAMs), clasificados como tipo I o II en base a sus efectos a nivel de corrientes macroscópicas. Si bien ambos incrementaron el pico de la corriente, los PAMs tipo I produjeron mínimos o nulos cambios en la velocidad de desensibilización del receptor, mientras que los PAMs tipo II disminuyeron dicha velocidad notoriamente e incrementaron la reactivación de receptores desde el estado desensibilizado. Para descifrar el origen molecular de dichos efectos se exploró la potenciación a nivel de corrientes unitarias. Se demostró que los PAMs no afectaron la amplitud máxima del canal, incrementaron el tiempo de estado abierto e indujeron la aparición de episodios de activación sostenidos, modificando así la cinética del receptor en los dos casos. Mientras que los PAMs tipo I promovieron episodios de activación con una duración moderada denominados *bursts*, los PAMs tipo II generaron *clusters* de muy larga duración, conformados por varios *bursts* agrupados. La potenciación por ambos tipos de PAMs también fue diferencialmente afectada por la temperatura, siendo los PAMs tipo II los más sensibles, con una actividad potenciadora significativamente menor a temperatura fisiológica en comparación con el accionar a temperatura ambiente. Esta información resulta muy relevante dado que usualmente la caracterización de los PAMs *in vitro* es llevada a cabo a temperatura ambiente, pero para su potencial uso terapéutico es indispensable el conocimiento de sus efectos a temperaturas fisiológicas. Además, se comprobó que los determinantes estructurales transmembrana influyen en la potenciación por los dos tipos de PAMs, principalmente en los PAMs tipo II, mientras que los PAMs tipo I resultan menos sensibles. Sin embargo, también se identificaron algunos PAMs tipo I notablemente influenciados por los determinantes transmembrana, con un comportamiento intermedio, más semejante al de los PAMs tipo II. En conjunto, estos resultados aportan información esencial para la implementación de agonistas y PAMs de $\alpha 7$ como agentes terapéuticos en desórdenes donde exista una señalización colinérgica deficiente.

En la **parte II** se reveló una conexión entre los efectos benéficos comunes ejercidos por los flavonoides y el receptor $\alpha 7$ homomérico en el sistema nervioso central, ya que estos compuestos naturales presentaron actividad $\alpha 7$ -PAM. Se evaluaron prototipos de las tres principales clases de flavonoides: genisteína, quercetina y 5,7-dihidroxi-4-fenilcumarina como neoflavonoide. Se demostró que todos ellos potenciaron las corrientes macroscópicas y microscópicas evocadas por la acetilcolina y no recuperaron receptores desde el estado desensibilizado. Dicha caracterización funcional permitió clasificarlos como PAMs tipo I. Utilizando receptores $\alpha 7$ mutantes y quiméricos se comprobó que los flavonoides comparten determinantes estructurales de potenciación transmembrana con otros PAMs. Estos compuestos polifenólicos no sólo aumentaron la respuesta ionotrópica del receptor $\alpha 7$, sino también la metabotrópica. Se verificó que los mismos potenciaron la disminución de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelulares ejercida por la activación de $\alpha 7$, en forma independiente de su efecto antioxidante intrínseco. Tanto es así que la actividad $\alpha 7$ -PAM de los flavonoides se propone como un mecanismo adicional por el cual estos compuestos naturales ejercerían su acción antioxidante y su efecto neuroprotector mediado por receptor.

En la **parte III** se sintetizó una novedosa serie de compuestos sintéticos derivados de 1,2,3-triazol 1,4-disustituidos con grupos arilo y fosfonato, que presentaron actividad $\alpha 7$ -PAM. El compuesto de mayor eficacia fue el derivado funcionalizado con el grupo fosfonato de metilo, el cual se comportó como PAM tipo I, potenciando las corrientes macroscópicas y microscópicas evocadas por la acetilcolina de forma compatible con su clasificación. La potenciación por este compuesto fue influenciada por los determinantes estructurales transmembrana, compartidos también por los PAMs tipo II. Además, se aplicaron diversas estrategias de relación estructura-actividad para obtener derivados más eficaces, como modificaciones en la longitud de las cadenas carbonadas, variación del grupo aromático e inversión de la geometría del triazol. Esta última fue la única que permitió conservar el accionar $\alpha 7$ -PAM del derivado con fosfonato de metilo. Por lo tanto, estos hallazgos permiten proponer a este compuesto como un novedoso farmacóforo de interés, que no sólo exhibe actividad potenciadora por sí mismo, sino que también resulta útil como plataforma para el desarrollo de nuevos agentes potencialmente terapéuticos.

El **capítulo II** se centró en el estudio de la función molecular del **receptor $\alpha 7$ heteromérico**, particularmente del **receptor $\alpha 7\beta 2$** , cuya presencia ha sido confirmada en cerebro anterior basal, corteza e hipocampo. Para descifrar el impacto de la incorporación de subunidades $\beta 2$ en el pentámero de subunidades $\alpha 7$, se generaron receptores con estequiometrías definidas y controladas mediante dos estrategias: la tecnología de concatámeros y la técnica de *electrical fingerprinting*, que utilizan subunidades covalentemente unidas y no enlazadas respectivamente. Se determinó que las estequiometrías conteniendo una, dos y tres subunidades $\beta 2$ dieron lugar a receptores $\alpha 7\beta 2$

funcionales. En relación a la activación ortostérica, a medida que el número de subunidades $\beta 2$ aumentó en el arreglo pentamérico, la amplitud y la conductancia unitaria permanecieron constantes, mientras que la duración de las aperturas y de los episodios de activación sostenidos se prolongaron significativamente, debido a una disminución en la velocidad de desensibilización. La activación en episodios sostenidos o *bursts* constituyó la marca o huella cinética distintiva del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico. Además, la subunidad $\beta 2$ no aportó su cara complementaria al sitio ortostérico de unión, sino que la activación eficaz por acetilcolina ocurrió únicamente a través de interfaces $\alpha 7/\alpha 7$. En relación a los PAMs, originalmente desarrollados como selectivos para el receptor $\alpha 7$ homomérico, se observó que también ejercieron modulación alostérica positiva sobre el receptor $\alpha 7\beta 2$ heteromérico, pero de forma diferencial. Los PAMs tipo I fueron más selectivos para el receptor homomérico, ya que su actividad potenciadora disminuyó con la presencia de subunidades $\beta 2$ en el pentámero hasta ser prácticamente nula. En cambio, los PAMs tipo II no resultaron selectivos, dado que potenciaron por igual a los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos, enmascarando sus diferencias cinéticas intrínsecas. Lo mismo ocurrió con la activación alostérica por agonistas alostéricos, que además poseen la capacidad de actuar como PAMs tipo II. Por lo tanto, este estudio constituye la primera caracterización a nivel de canal único de receptores $\alpha 7$ heteroméricos, demostrando las posibles estequiometrías que dan origen a receptores funcionales y la huella cinética de cada uno. Estos resultados contribuyen al entendimiento del rol distintivo de este nuevo receptor y a su identificación funcional en sistemas nativos, ya que por el momento no existen ligandos selectivos. Además, dado que los PAMs de $\alpha 7$ también potenciaron a $\alpha 7\beta 2$, se propone a la selectividad diferencial como un parámetro importante a considerar para el diseño y desarrollo de moduladores más específicos.

También se generaron **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 4$** con estequiometrías definidas, para comparar el impacto diferencial de la presencia de distintas subunidades β en el arreglo pentamérico. Las estequiometrías conteniendo una y dos subunidades $\beta 4$ dieron lugar a receptores $\alpha 7\beta 4$ funcionales. En la activación ortostérica de los mismos por acetilcolina, se observó que a mayor número de subunidades $\beta 4$ en el pentámero la amplitud de las corrientes unitarias aumenta, a diferencia de lo ocurrido con $\beta 2$; mientras que las duraciones de las aperturas y de los episodios de activación se incrementan de forma similar a lo ocurrido con $\beta 2$, pero más notoriamente, con una alta frecuencia. De este modo, la funcionalidad de los receptores $\alpha 7\beta 4$ en el sistema de expresión heterólogo empleado, junto con otras evidencias experimentales, sustentan la potencial existencia de otros receptores $\alpha 7$ heteroméricos *in vivo*, además del subtipo $\alpha 7\beta 2$ ya identificado en el sistema nervioso central.

En conjunto, el presente trabajo de tesis permitió descifrar los **mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica de los receptores homoméricos $\alpha 7$ y heteroméricos $\alpha 7\beta 2$** , los cuales exhibieron propiedades y perfiles funcionales particulares. Esto sugiere que ambos subtipos de receptores $\alpha 7$ podrían actuar *in vivo* a distinta escala temporal, pero con un patrón espacial compartido en algunas áreas del sistema de neuromodulación colinérgico, ejerciendo un impacto diferencial en los circuitos neuronales asociados a cognición y memoria. La información aportada contribuye entonces no sólo a la dilucidación del rol fisiológico distintivo de los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos con sus respectivas implicancias fisiopatológicas, sino también al diseño, desarrollo y optimización de nuevos agentes terapéuticos más selectivos.

ACTIVATION AND ALLOSTERIC MODULATION OF $\alpha 7$ HOMOMERIC AND HETEROMERIC NICOTINIC RECEPTORS

SUMMARY

Acetylcholine plays a major role as neuromodulator in the central nervous system, mainly at the level of neural circuits associated to cognition, memory, learning, attention, reward and sensory gating, by modifying the response to internal and external inputs. Cholinergic signaling occurs by synaptic and extrasynaptic transmission, the latter being the main mechanism involved in the modulation of neuronal excitability, presynaptic neurotransmitter release, neuronal plasticity and coordinated firing of groups of neurons in the brain.

The effect of acetylcholine as a neuromodulator depends not only on the site of release and the target neuron, but also on the receptors through which acetylcholine acts. In this regard, the ionotropic **nicotinic receptors** are a key piece in the brain cholinergic system. They are pentameric ligand-gated ion channels, members of the *Cys-loop* receptor family. Nicotinic receptors are permeable to cations and can be formed by five identical subunits or different subunit combinations, giving place to homomeric or heteromeric receptors, respectively. Each nicotinic receptor subtype has a defined stoichiometry, which means a particular composition and spatial arrangement of subunits, that is responsible for the biophysical, pharmacological and functional properties of the channel and it is intimately related to the differential physiological role.

One of the most abundant nicotinic subunits in the central nervous system is **$\alpha 7$** , traditionally known by its ability to form homomeric receptors due to its ancestral evolutionary origin. However, recent evidence demonstrated that $\alpha 7$ has also the ability to co-assemble with other subunits to generate heteromeric receptors, for instance the novel $\alpha 7\beta 2$ subtype. Several neurological, mental, inflammatory and neurodegenerative disorders are accompanied by a defective cholinergic signaling, therefore, $\alpha 7$ nicotinic receptors are promising therapeutic targets. In this thesis, by using electrophysiological techniques, we deciphered the molecular basis of the activation and modulation of $\alpha 7$ homomeric and heteromeric nicotinic receptors, with the final aim of elucidating the differential impact of both subtypes in the cholinergic signaling in the central nervous system.

Chapter I was divided into three parts and was focused on the study of the molecular function of **$\alpha 7$ homomeric receptor** at the macroscopic and microscopic level. This receptor exhibits particular kinetic and pharmacological properties that make it ideal for mediating extrasynaptic transmission processes, including high permeability to calcium ions and the ability to transform transient ionotropic responses into sustained metabotropic signaling events.

In **Part I**, the molecular mechanisms of activation and modulation of $\alpha 7$ homomeric receptor were analysed. In the presence of acetylcholine, the receptor activated and desensitized with rapid kinetics, mostly evoking brief isolated openings. On the contrary, allosteric activation showed a radically different molecular mechanism, with a slowdown in the desensitization kinetics that allows the prolongation of individual openings and their grouping into very long-lasting sustained activation episodes. We also evaluated the potentiation by prototype compounds, previously reported as positive allosteric modulators (PAMs) and classified as type I or II depending on their effect at the macroscopic current level. Although both types of PAMs increased the peak current, type I PAMs produced minimal or no changes in the receptor desensitization rate, whereas type II PAMs decreased notoriously that rate and increased reactivation of receptors from desensitized states. To decipher the molecular origin of these effects, potentiation was explored at the single-channel current level, and revealed that both type of PAMs did not affect the maximal channel amplitude, increased open-channel lifetime and induced sustained activation episodes, thus modifying receptor kinetics in both cases. While type I PAMs provoked activation episodes with moderate duration named *bursts*, type II PAMs generated very long duration *clusters*, consisting of several grouped *bursts*. We showed that potentiation by both types of PAMs was differentially affected by temperature, being type II PAMs more sensitive and less active at a more physiological temperature than at room temperature. This information is useful given that PAMs have been usually characterized *in vitro* at room temperature, but for their therapeutic use it is necessary to know their effects at more physiological temperatures. In addition, it was demonstrated that transmembrane structural determinants influence potentiation by both types of PAMs, mainly by type II PAMs, while type I PAMs are less sensitive. Nevertheless, some type I PAMs significantly influenced by transmembrane determinants were also identified, with an intermediate behaviour, more similar to that of type II PAMs. Overall, these results provide important information required for the implementation of $\alpha 7$ agonists and PAMs as therapeutic tools for disorders with a defective cholinergic signaling.

In **Part II**, a link between the common beneficial effects exerted by flavonoids and $\alpha 7$ homomeric receptor in the central nervous system was revealed, since these natural compounds showed $\alpha 7$ -PAM activity. We evaluated prototypes from the three main flavonoids classes: genistein, quercetin and 5,7-dihydroxy-4-phenylcoumarin as a neoflavonoid. All flavonoids enhanced macroscopic and microscopic currents elicited by acetylcholine and did not recover receptors from the desensitized state, thus allowing us to classify them as type I PAMs. By using mutant and chimeric $\alpha 7$ receptors, we demonstrated that flavonoids share transmembrane structural determinants with other PAMs. These polyphenolic compounds not only increased the receptor ionotropic response, but also the metabotropic one, further reducing the generation of intracellular reactive oxygen species elicited by $\alpha 7$ activation, independently of their direct antioxidant activity. Thus, we propose $\alpha 7$ -PAM activity of

flavonoids as an additional mechanism by which these natural compounds might exert their receptor-mediated antioxidant action and neuroprotective effect.

In **Part III**, a novel series of synthetic compounds derived from 1,2,3-triazoles 1,4-disubstituted with aryl and phosphonate groups that exhibited $\alpha 7$ -PAM activity was synthesized. The most effective compound was the methyl phosphonate-functionalized derivative, which behaves as type I PAM, enhancing the macroscopic and microscopic currents elicited by acetylcholine, in a manner compatible with its classification. Potentiation was influenced by transmembrane structural determinants, also shared by type II PAMs. In addition, several structure-activity relationship strategies were applied to obtain more effective derivatives, for instance modifications of the carbon chains lengths, variation of the aromatic group and inversion of the triazole geometry. The last one allowed the compound to preserve the $\alpha 7$ -PAM activity of the methyl phosphonate derivative. Therefore, these results propose this compound not only as a novel pharmacophore with intrinsic PAM activity, but also as a scaffold for the development of new potential therapeutic agents.

Chapter II was focused on the study of the molecular function of **$\alpha 7$ heteromeric receptors**, particularly **$\alpha 7\beta 2$ receptor**, whose presence has been confirmed in basal forebrain, cortex and hippocampus. To decipher the impact of $\beta 2$ subunits incorporation into the pentamer of $\alpha 7$ subunits, receptors with fixed and controlled stoichiometries were generated by two approaches: concatemeric technology and electrical fingerprinting technique, which use concatenated and unlinked subunits respectively. It was determined that stoichiometries containing one, two and three $\beta 2$ subunits gave place to functional $\alpha 7\beta 2$ receptors. Regarding orthosteric activation, as the number of $\beta 2$ subunits increased in the pentameric arrangement, the amplitude and the single-channel conductance remained constant, while durations of openings and sustained activation episodes were significantly prolonged, due to a decrease in the desensitization rate. Activation in sustained episodes or *bursts* conforms the kinetic signature of $\alpha 7\beta 2$ heteromeric receptors with respect to $\alpha 7$ homomeric receptor. Moreover, $\beta 2$ subunit did not provide the complementary face of the orthosteric binding site, so the efficacious activation by acetylcholine occurred only through $\alpha 7/\alpha 7$ interfaces. Originally developed as selective for $\alpha 7$ homomeric receptors, we showed that PAMs also exerted positive allosteric modulation on $\alpha 7\beta 2$ heteromeric receptors, but in a differential manner. On the one hand, type I PAMs were more selective for the homomeric receptor, since their potentiating activity decreased with the presence of $\beta 2$ subunits in the pentamer up to be practically null. On the other hand, type II PAMs were not selective, because they enhanced equally all $\alpha 7$ homomeric and heteromeric receptors, masking their intrinsic kinetic differences. The same occurred with the allosteric activation by allosteric agonists, which also have the capacity to act as type II PAMs. This study constitutes the first single-channel characterization of $\alpha 7$ heteromeric receptors, revealing the stoichiometries that may result in

functional receptors and the kinetic signature of each one. These results contribute to the understanding of the distinctive role of this novel receptor and will help to its functional identification in native systems because no selective ligands are available to date. Since $\alpha 7$ PAMs also potentiated $\alpha 7\beta 2$ receptors, we propose the differential selectivity as an important parameter to consider for the design and development of more specific modulators.

Furthermore, **$\alpha 7\beta 4$ heteromeric receptors** with fixed stoichiometry were generated in order to compare the differential impact of distinct β subunits presence into the pentameric arrangement. Stoichiometries containing one and two $\beta 4$ subunits gave place to functional $\alpha 7\beta 4$ receptors. Regarding orthosteric activation by acetylcholine, it was observed that as the number of $\beta 4$ subunits in the pentamer increases, the single-channel amplitude rises unlike what occurred with $\beta 2$, whereas durations of openings and sustained activation episodes increase similarly to what occurred with $\beta 2$ subunits, but more significantly, with a higher frequency. The functionality of $\alpha 7\beta 4$ receptors in the heterologous expression system used, together with other experimental evidences, support the potential existence of other $\alpha 7$ heteromeric receptors *in vivo*, besides the $\alpha 7\beta 2$ subtype already identified in central nervous system.

On the whole, this thesis work allowed to decipher the **molecular mechanisms of activation and allosteric modulation of $\alpha 7$ homomeric and $\alpha 7\beta 2$ heteromeric receptors**, which exhibited particular functional profiles and properties. It suggests that both $\alpha 7$ receptors subtypes could act *in vivo* at distinct temporal scale, but with a shared spatial pattern in some areas of the neuromodulation cholinergic system, exerting a differential impact at the neural circuits associated to cognition and memory. The provided information not only contributes to elucidating the physiological role of $\alpha 7$ homomeric and heteromeric receptors with their respective pathophysiological implications, but also to the design, development and optimization of novel more selective therapeutic agents.

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	VI
ÍNDICE	X
INTRODUCCIÓN	2
1. ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO	2
1.1. Mecanismos de comunicación intercelular en el sistema nervioso central	2
1.1.1. Transmisión sináptica.....	3
1.1.2. Transmisión extrasináptica	4
1.2. Neurotransmisores	6
1.3. Receptores de neurotransmisores.....	6
2. SEÑALIZACIÓN COLINÉRGICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	7
2.1. Mecanismos de transmisión colinérgica: efecto neuromodulador de la acetilcolina	8
2.2. Receptores de acetilcolina	9
2.2.1. Receptores muscarínicos	9
2.2.2. Receptores nicotínicos	10
3. RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	10
3.1. Estructura.....	10
3.1.1. Dominio extracelular	12
3.1.2. Dominio transmembrana	14
3.1.3. Dominio intracelular	16
3.2. Mecanismo funcional de transducción de señal: transiciones alostéricas.....	18
3.2.1. Estado cerrado	19
3.2.2. Estados intermedios: <i>flipped</i> y <i>primed</i>	19
3.2.3. Estado abierto: mecanismos moleculares de gatillado	20
3.2.4. Estado desensibilizado	22
3.3. Subtipos de receptores nicotínicos: distribución y funcionalidad diferencial.....	24
4. RECEPTOR NICOTÍNICO NEURONAL $\alpha 7$	27
4.1. Generalidades	27
4.2. Modulación farmacológica	30
4.2.1. Ligandos ortostéricos	30
4.2.1.1. Agonistas ortostéricos	30
4.2.1.2. Antagonistas competitivos	31
4.2.2. Ligandos alostéricos	31
4.2.2.1. Moduladores alostéricos positivos (PAMs)	32
4.2.2.2. Moduladores alostéricos negativos (NAMs)	33
4.2.2.3. Moduladores alostéricos silentes (SAMs)	34
4.2.2.4. Agonistas alostéricos o ago-PAMs.....	34
4.2.2.5. Sitios alostéricos y determinantes estructurales	34
4.3. Relevancia clínica: activación y modulación del receptor nicotínico $\alpha 7$ como estrategia terapéutica	36
METODOLOGÍA	41
1. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTOR NICOTÍNICO SALVAJES, MUTANTES Y QUIMÉRICAS.....	41

2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTOR NICOTÍNICO CONCATENADAS	42
2.1. Optimización de la composición y longitud de los <i>linkers</i> peptídicos	42
2.2. Construcción de concatámeros	44
2.3. Estequiometrías de los receptores concataméricos $\alpha 7$ heteroméricos	46
3. DROGAS PARA LA ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS	46
4. ENSAYOS EXPERIMENTALES EN OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	46
4.1. Animales	46
4.2. Obtención, aislamiento y selección de ovocitos	47
4.3. Expresión heteróloga de receptores	48
4.4. Electrofisiología: <i>voltage-clamp</i> de dos electrodos (TEVC)	49
4.4.1. Soluciones	50
4.4.2. Microelectrodos	51
4.4.3. TEVC manual	51
4.4.4. TEVC automatizado	51
4.4.5. Análisis de las corrientes macroscópicas	52
5. ENSAYOS EXPERIMENTALES EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS	53
5.1. Cultivo celular	53
5.2. Expresión heteróloga de receptores	53
5.3. Electrofisiología: <i>patch-clamp</i>	55
5.3.1. Microelectrodos	57
5.3.2. Equipamiento	57
5.3.3. Corrientes microscópicas o unitarias: configuración <i>cell-attached</i>	57
5.3.3.1. Soluciones	57
5.3.3.2. Condiciones de obtención del registro de corrientes unitarias	58
5.3.3.3. Análisis de las corrientes unitarias	59
5.3.4. Corrientes macroscópicas: configuración <i>whole-cell</i>	61
5.3.4.1. Soluciones	61
5.3.4.2. Condiciones de obtención del registro de corrientes macroscópicas	61
5.3.4.3. Análisis de las corrientes macroscópicas	62
5.4. Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno	63
5.4.1. Fluorimetría	63
5.4.2. Microscopía de fluorescencia	64
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
CAPÍTULO I	66
ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha 7$ HOMOMÉRICO	66
INTRODUCCIÓN	66
OBJETIVOS GENERALES	68
<u>PARTE I</u> : Mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica	69
Antecedentes y objetivos específicos	69
Resultados	72
1. ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR HOMOMÉRICO $\alpha 7$	72
1.1. Activación ortostérica por ACh	72
1.2. Activación alostérica por 4BP-TQS	75
2. MODULACIÓN ALOSTÉRICA POSITIVA DEL RECEPTOR HOMOMÉRICO $\alpha 7$	76
2.1. Modulación alostérica positiva por PAMs tipo I y II	76
2.2. Influencia de la temperatura en la modulación alostérica positiva	81

2.3. Determinantes estructurales de la modulación alostérica positiva	87
Discusión	91
PARTE II: Modulación alostérica por flavonoides.....	103
Antecedentes y objetivos específicos	103
Resultados	106
1. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DEL EFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE EL RECEPTOR $\alpha 7$ HOMOMÉRICO	106
1.1. Potenciación de corrientes macroscópicas.....	106
1.2. Potenciación de corrientes unitarias	110
2. DETERMINANTES ESTRUCTURALES DE LA POTENCIACIÓN POR FLAVONOIDES.....	113
3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES MEDIADA POR EL RECEPTOR $\alpha 7$	116
Discusión	121
PARTE III: Modulación alostérica por derivados de 1,2,3-triazol funcionalizados con grupos fosfonato	131
Antecedentes y objetivos específicos	131
Resultados	134
1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DE 1,2,3-TRIAZOLES 1,4-DISUSTITUIDOS FUNCIONALIZADOS CON GRUPOS FOSFONATO	134
1.1. Síntesis.....	134
1.2. Evaluación de la actividad biológica sobre el receptor $\alpha 7$ homomérico	134
2. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL 1,2,3-TRIAZOL FUNCIONALIZADO CON EL GRUPO FOSFONATO DE METILO (3a) SOBRE EL RECEPTOR $\alpha 7$ HOMOMÉRICO	138
2.1. Modulación alostérica positiva	138
2.2. Determinantes estructurales de la potenciación.....	140
2.3. Estudios de relación estructura-actividad.....	142
2.3.1. Variación de la distancia triazol-grupo arilo.....	143
2.3.2. Variación de la distancia triazol-grupo fosfonato	144
2.3.3. Variación del grupo arilo	145
2.3.4. Inversión de la geometría del triazol.....	146
Discusión	147
CONCLUSIONES PARCIALES: CAPÍTULO I.....	152
CAPÍTULO II.....	155
ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DE RECEPTORES $\alpha 7$ HETEROMÉRICOS	155
INTRODUCCIÓN	155
OBJETIVOS GENERALES	157
Antecedentes y objetivos específicos	158
Resultados	162
1. RECEPTORES HETEROMÉRICOS $\alpha 7\beta 2$	162
1.1. Receptores concataméricos o concatámeros.....	162
1.1.1. Activación y modulación alostérica del concatámero $\alpha 7$	163
1.1.2. Activación y modulación alostérica de los concatámeros $\alpha 7\beta 2$	164
1.1.2.1. Activación ortostérica por ACh	164
1.1.2.2. Activación alostérica por 4BP-TQS.....	170
1.1.2.3. Modulación alostérica positiva por PAMs tipo I y II	170
1.2. <i>Electrical fingerprinting</i>	175
1.2.1. Control de proteólisis	176

1.2.2. Receptores $\alpha 7\beta 2$ a partir de subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ no concatenadas	177
1.2.2.1. Estequiometrías de los receptores $\alpha 7\beta 2$ funcionales.....	177
1.2.2.2. Interfaz de activación ortostérica	179
2. RECEPTORES HETEROMÉRICOS $\alpha 7\beta 4$	180
Discusión	184
CONCLUSIONES PARCIALES: CAPÍTULO II.....	197
CONCLUSIONES GENERALES.....	200
BIBLIOGRAFÍA	202
ABREVIATURAS	214
PUBLICACIONES	216

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO

En el sistema nervioso existen dos clases principales de células, las **neuronas** y las células de la **glía**, que incluyen macroglía –astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann– y microglía –células inmunes–. Mientras que las neuronas constituyen la unidad básica de señalización eléctrica, las células gliales cumplen principalmente un rol de soporte metabólico de las células nerviosas y de mantenimiento de su microambiente óptimo, controlando la inflamación ante injuria, infección y neurodegeneración. Sin embargo, evidencias recientes han demostrado una influencia más marcada por parte de la glía en la funcionalidad neuronal, en procesos tales como plasticidad, señalización y comunicación a lo largo del desarrollo y en estadios maduros (Allen y Lyons, 2018).

Pese a la gran variedad de neuronas existentes, la complejidad del sistema nervioso radica principalmente en la organización de las neuronas en **circuitos neuronales** con funciones precisas. Por esta razón, neuronas con propiedades similares pueden exhibir efectos completamente diferentes si los patrones de interconexión que establecen son distintos entre sí. Considerando los circuitos neuronales que procesan información similar se establece una clasificación funcional del sistema nervioso, incluyendo **sistemas sensoriales** (adquisición y procesamiento de la información de los ambientes externo e interno), **sistemas motores** (generación de respuestas motoras ante la información sensorial percibida) y **sistemas asociativos** (mediación de funciones superiores complejas, como cognición, atención, memoria, emoción, etc.).

Convencionalmente, desde el punto de vista anatómico, el sistema nervioso se divide en componentes periféricos y centrales. El **sistema nervioso periférico (SNP)** incluye los nervios espinales y craneales que conducen los estímulos sensoriales hacia órganos centrales, y desde allí, la respuesta motora a ejecutar por parte de los efectores. Según estos últimos, el SNP motor se subdivide en somático o voluntario si el efector es músculo esquelético, y autónomo o visceral si los efectores son músculo liso, músculo cardíaco o glándulas. El **sistema nervioso central (SNC)** incluye el encéfalo (cerebro, cerebelo y tallo encefálico) y la médula espinal, los cuales constituyen los principales centros de análisis e integración de la información sensorial y motora.

1.1. Mecanismos de comunicación intercelular en el sistema nervioso central

Se han identificado diferentes formas de comunicación intercelular en el SNC, no sólo para la transmisión de información neurona-neurona, sino también neurona-glía y entre los distintos tipos de células gliales. Además, el concepto de “**mensajero o transmisor**” que media dicha comunicación también se ha extendido a diferentes tipos de moléculas: aminoácidos, monoaminas, péptidos, gases, neuroesteroides, iones, etc.

Es así que pueden distinguirse dos grandes modos de comunicación intercelular complementarios e integrados en el SNC: **wired-transmission**, que incluye las formas de **transmisión sináptica** clásicas, y **volume-transmission** o **transmisión extrasináptica**, que incluye también las formas de transmisión perisináptica (Zoli *et al.*, 1999; Agnati *et al.*, 2010).

1.1.1. Transmisión sináptica

El término **sinapsis** refiere a la estructura funcional que posibilita el contacto entre neuronas (sinapsis interneuronal) o entre neuronas y efectores (sinapsis neuroefectoras) para permitir el pasaje de información de una célula a la contigua, mediando su comunicación directa de forma eficiente por un proceso denominado **transmisión sináptica**. Considerando criterios morfológicos y funcionales, en el sistema nervioso pueden encontrarse distintos **tipos de sinapsis**: químicas, eléctricas y mixtas. En la sinapsis eléctrica existe un contacto intercelular físico entre neuronas dado por uniones en hendidura o *gap junctions*, consistentes en canales (conexones) a través de los cuales la corriente iónica fluye en forma directa y rápida entre las células. Este tipo de transmisión sináptica eléctrica suele estar presente en sinapsis que median reflejos rápidos o que implican la sincronización y coordinación de la actividad de grupos de neuronas en el SNC. A menudo se observan sinapsis mixtas, donde la transmisión eléctrica y química coexisten. Sin embargo, el modo de transmisión sináptica preponderante en el sistema nervioso es a través de sinapsis químicas.

La **sinapsis química** queda establecida entre tres elementos: el terminal axónico de una **neurona presináptica**, la **hendidura sináptica** y la **neurona postsináptica** (Figura 1). La transmisión sináptica se inicia cuando un potencial de acción arriba por el axón de la neurona presináptica hasta alcanzar el terminal. La membrana experimenta un cambio en su potencial que deriva en la apertura de canales de calcio (Ca^{+2}) dependientes de voltaje y en un rápido influjo de estos iones hacia el terminal presináptico. El incremento en la concentración de Ca^{+2} intracelular provoca la exocitosis de las vesículas sinápticas que contienen **neurotransmisores (NT)**, los cuales difunden por la hendidura sináptica hasta unirse a **receptores** específicos en la membrana de la neurona postsináptica, induciendo un cambio en su conductancia por apertura o cierre de canales iónicos. Esto ocasiona un potencial postsináptico que puede ser excitatorio (despolarización) o inhibitorio (hiperpolarización), incrementando o disminuyendo respectivamente la probabilidad de que la neurona postsináptica desencadene a su vez un potencial de acción.

Como características principales de la transmisión sináptica química se destacan: una alta concentración del NT liberado en el pequeño espacio de la hendidura sináptica, la presencia de receptores postsinápticos densamente agrupados y en general de baja afinidad, y una efectiva finalización del proceso por remoción de los NT de la hendidura, a través de enzimas de degradación o recaptación por transportadores celulares. La relación entre el NT y el receptor suele ser

aproximadamente 1 : 1 y la velocidad de esta forma de comunicación es rápida, del orden de los milisegundos.

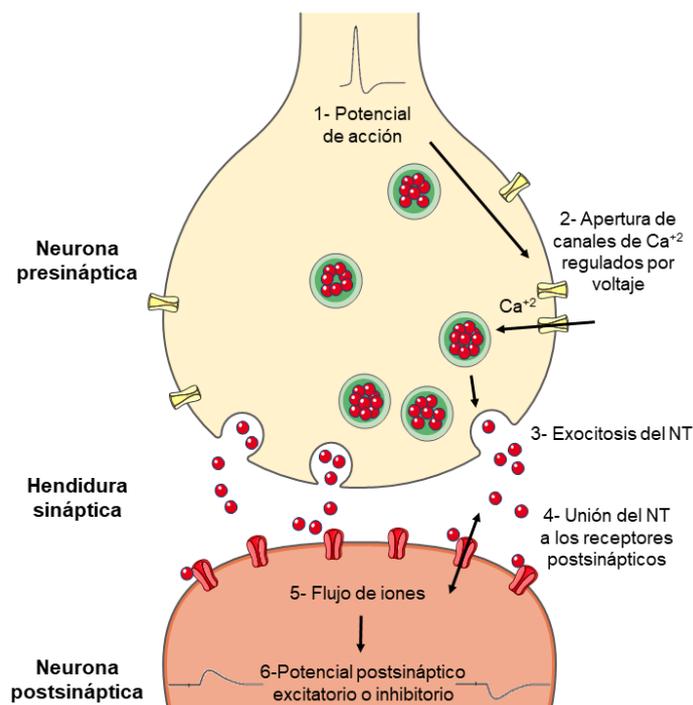


Figura 1. Mecanismo de transmisión sináptica química. Se observa la hendidura sináptica a través de la cual difunden los NT desde la neurona presináptica hacia la neurona postsináptica. La interacción del NT con el receptor postsináptico deriva en la generación de un potencial postsináptico.

1.1.2. Transmisión extrasináptica

La **transmisión extrasináptica** o **por volumen** se caracteriza por la ausencia de una estructura de contacto o comunicación especializada entre la célula que origina la señal y la célula blanco que contiene los receptores, ya que el transmisor se moviliza libremente por el fluido extracelular, incluido el líquido cefalorraquídeo del SNC. La naturaleza de la señal transmisora extrasináptica es amplia, abarcando señales químicas, como los NT y iones que también median la transmisión sináptica, y señales físicas, como los potenciales de campo (cambios en la composición iónica del fluido extracelular por la actividad de canales iónicos).

Los mensajeros químicos pueden ser liberados desde células gliales y/o neuronas, incluyendo sus distintas estructuras (dendritas, soma, axón y sus terminales), hacia el espacio extracelular y por allí moverse influenciando la actividad de otras células dentro del SNC que posean receptores localizados en forma perisináptica y extrasináptica. El movimiento de los transmisores se basa en procesos de difusión y convección dirigidos por distintos gradientes energéticos.

La transmisión extrasináptica de tipo perisináptica (o “sinapsis abierta”) es la más vinculada a la transmisión sináptica, puesto que algunos NT liberados desde el terminal axónico pueden difundir

desde la hendidura sináptica y unirse a receptores perisinápticos de las neuronas presináptica o postsináptica, o de los astrocitos (Figura 2).

La transmisión extrasináptica más preponderante en el SNC va más allá de la región perisináptica, con sitios de liberación del NT y sitios de localización del receptor netamente extrasinápticos, de modo que la molécula transmisora debe movilizarse por una distancia considerable a través del líquido extracelular antes de alcanzar su destino, siempre fuera de las sinapsis clásicas (Figura 2). Esto se evidencia por la discordancia en la localización física de los receptores específicos de ciertos NT y de sus sitios de liberación, siendo frecuente la presencia de terminales axónicos no sinápticos y de varicosidades a lo largo del axón que contienen vesículas de NT.

Como características principales de la transmisión extrasináptica se destacan: una menor concentración del NT liberado que se diluye en el fluido extracelular, la presencia de receptores extrasinápticos menos agregados y en general de mayor afinidad, y una vida media de la señal más larga durante su movilización, que también depende de la inactivación por enzimas, recaptación por transportadores, etc. La relación entre el NT y el receptor suele ser aproximadamente $1 : >1$ y la velocidad de esta forma de comunicación es más lenta, con un orden mayor al milisegundo, llegando incluso a minutos.

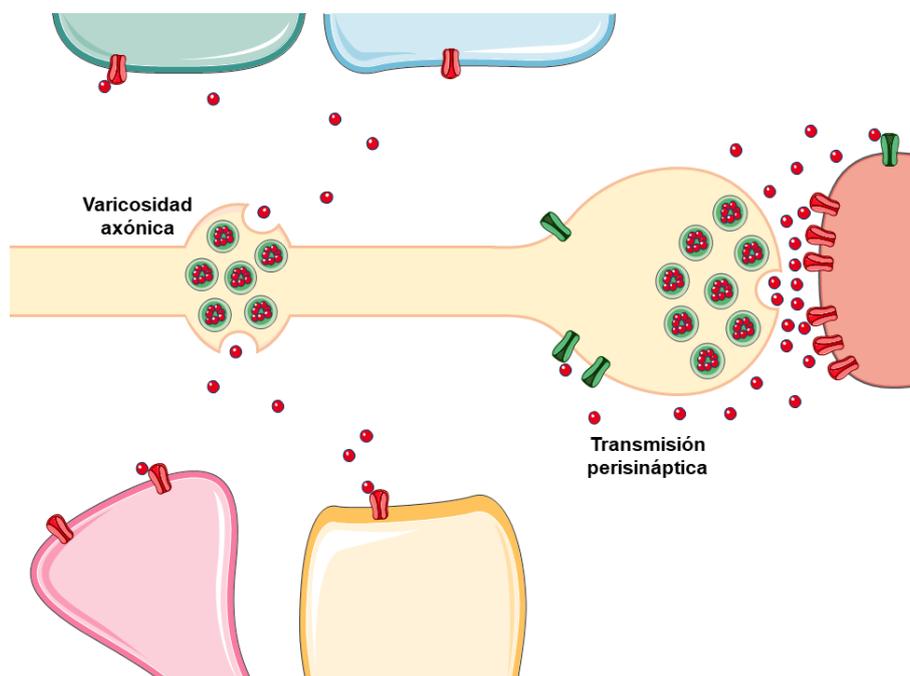


Figura 2. Mecanismos de transmisión extrasináptica. Se observan dos formas típicas de comunicación extrasináptica en el SNC. Por un lado, los NT son liberados desde una localización netamente extrasináptica, como las varicosidades axónicas, y difunden hacia receptores también extrasinápticos (izquierda). Por otro lado, los NT liberados desde un terminal axónico pueden difundir fuera de la hendidura sináptica y unirse a receptores perisinápticos (verde), ya sean de la neurona presináptica o postsináptica (derecha).

1.2. Neurotransmisores

Los NT son mensajeros químicos que controlan en forma directa o indirecta la apertura o cierre de canales iónicos, mediando la comunicación intercelular de modo sináptico y extrasináptico. Los NT pueden clasificarse en dos categorías:

- **NT clásicos o de molécula pequeña:** incluyen acetilcolina (ACh, *Acetylcholine*), catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina), serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) y aminoácidos como glutamato (Glu), ácido γ -aminobutírico (GABA) y glicina (Gly). Los mismos son sintetizados en el terminal presináptico quedando almacenados en pequeñas vesículas, y en general median acciones sinápticas rápidas.

- **NT no clásicos:** incluyen por ejemplo a los neuropéptidos, que son sintetizados en el soma neuronal a partir de un precursor proteico y luego transportados al terminal presináptico. En general modulan funciones neuronales más lentas y continuas.

Suele denotarse a las neuronas en función del NT principal por el cual median la comunicación hacia otra célula (Ej. neuronas colinérgicas para ACh, neuronas glutamatérgicas para Glu, etc.). Sin embargo, según los patrones de actividad sináptica, las neuronas pueden sintetizar y liberar más de un NT, y a dichos mensajeros adicionales se los denomina “co-transmisores”. No sólo existe diversidad de NT, sino también de receptores para los mismos, siendo la interacción particular de un dado NT sobre un receptor específico la que define el efecto o respuesta final que se genera en la célula blanco.

1.3. Receptores de neurotransmisores

Los receptores de NT son proteínas integrales de membrana con un sitio de unión específico para el NT, y es debido a esta interacción ligando-receptor que se producen cambios conformacionales en este último, conduciendo de forma **directa** o **indirecta** a la apertura o al cierre de canales iónicos. Es así que los receptores de NT se clasifican en:

- **Receptores ionotrópicos:** la molécula de receptor consiste en un canal iónico activado por un dado ligando (LGIC, *Ligand-Gated Ion Channel*), es decir, por un NT.

- **Receptores metabotrópicos:** el NT activa a la molécula de receptor, la cual por medio de una cascada de señalización intracelular deriva en la apertura o el cierre de canales iónicos. Generalmente son receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a proteína G (*G-Protein Coupled Receptors*, GPCR).

Un dado NT puede presentar ambos tipos de receptores, incluso en la misma sinapsis, para ejercer acciones fisiológicas a **distinta escala temporal**: rápida, mediada por receptores ionotrópicos (los potenciales postsinápticos son rápidos, se generan en un tiempo de 1-2 ms con una duración de

10 ms o menos), y más lenta, mediada por receptores metabotrópicos (los potenciales postsinápticos son lentos, con un rango de segundos a minutos o más).

La **localización** de los receptores de NT puede ser postsináptica o presináptica. Los **receptores postsinápticos** median la transmisión sináptica rápida clásica, es decir, la comunicación entre la neurona presináptica y postsináptica. Los **receptores presinápticos** están localizados en la membrana del axón o del terminal axónico de la neurona presináptica y median la **modulación positiva o negativa** de la liberación de NT, en una forma de comunicación o transmisión extrasináptica de tipo perisináptica. Dichos receptores pueden responder al mismo NT que libera la neurona presináptica (*autorreceptores*) o a otros liberados desde células vecinas (*heterorreceptores*). Algunos mecanismos de modulación propuestos, que pueden coexistir y ocurrir simultáneamente, incluyen cambios en el potencial de membrana que afectan a la propagación del potencial de acción y/o al funcionamiento de los canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje, y regulación del complejo proteico que posibilita la liberación de las vesículas presinápticas, puesto que algunos de sus componentes son sensibles a dicho ion (Miller, 1998; Schlicker y Feuerstein, 2017).

2. SEÑALIZACIÓN COLINÉRGICA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La **acetilcolina (ACh)**, el primer NT identificado, se sintetiza en un único paso por transferencia de un grupo acetilo a la colina (Ch, *Choline*) mediante la enzima acetiltransferasa de colina (ChAT), mientras que su degradación a acetato y colina es llevada a cabo por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Figura 3A). Si bien la mayoría de los experimentos iniciales se enfocaron en la placa neuromuscular, dieron paso a la posterior identificación de neuronas productoras de ACh en el SNC y de sus receptores neuronales implicados en la señalización colinérgica.

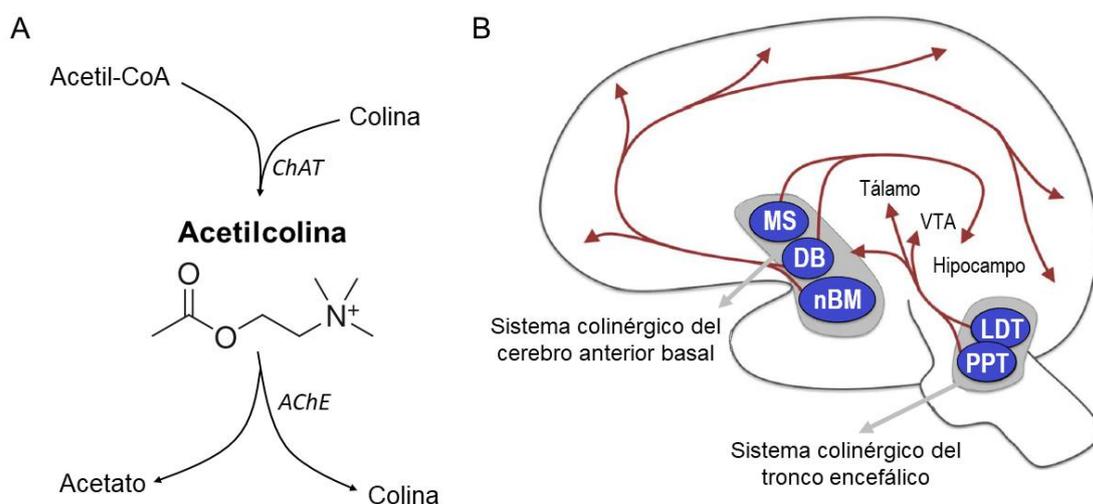


Figura 3. Señalización colinérgica en el SNC. A- Síntesis y degradación de la ACh. B- Se muestran las principales proyecciones de los sistemas colinérgicos del encéfalo: cerebro anterior basal (núcleos del septo medial -MS-, diagonal de Broca -DB- y núcleo de Meynert -nBM-) y tronco encefálico (núcleo pedunculopontino tegmental -PPT- y núcleo laterodorsal tegmental -LDT-). Modificado de (Newman *et al.*, 2012).

Existen dos **sistemas colinérgicos** principales en el encéfalo (Figura 3B) (Newman *et al.*, 2012; Ballinger *et al.*, 2016), desde los cuales grupos de neuronas colinérgicas emiten proyecciones hacia un amplio rango de regiones corticales y subcorticales:

- **Sistema del cerebro anterior basal:** incluye principalmente los núcleos del septo medial, banda diagonal de Broca y el núcleo basal magnocelular o de Meynert. Las proyecciones se dirigen al hipocampo, neocórtex, bulbo olfatorio y amígdala basolateral.

- **Sistema del tronco encefálico:** incluye principalmente los núcleos pedunculopontino, cuneiforme, área parabraquial y área tegmental lateral. Las proyecciones se dirigen al tálamo, núcleos dopaminérgicos del cerebro medio, núcleo interpeduncular, colículo superior y ganglios basales.

Dada la proyección de las neuronas colinérgicas hacia corteza e hipocampo, las **funciones de la señalización por ACh en el SNC** están principalmente asociadas a los procesos fisiológicos que ocurren en dichas áreas, como **aprendizaje, cognición, memoria, atención y procesamiento diferencial de los estímulos sensoriales** para incrementar la relación de la señal sobre el ruido del entorno (Hasselmo, 2006; Robinson *et al.*, 2011; Haam y Yakel, 2017).

2.1. Mecanismos de transmisión colinérgica: efecto neuromodulador de la acetilcolina

En contraposición al rol clásico de la ACh como NT en la placa neuromuscular y ganglios autónomos, la **transmisión sináptica** clásica mediada por la ACh en el SNC no constituye la principal forma de comunicación intercelular (Changeux, 2010). Sólo una baja proporción (8-15 %) de terminales axónicos de neuronas colinérgicas establecen contactos sinápticos con neuronas postsinápticas. Las sinapsis colinérgicas han sido detectadas en interneuronas y neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza visual, células del núcleo supraóptico y neuronas ganglionares ciliares de distintos animales (Lendvai y Vizi, 2008).

La **transmisión extrasináptica** resulta ser el principal mecanismo de transmisión colinérgica en el SNC, otorgándole a la ACh un rol crucial como **neuromodulador** de los circuitos neuronales del encéfalo asociados a **cognición, memoria, aprendizaje y atención**, principalmente por modulación de la excitabilidad neuronal, la liberación de NT, la respuesta postsináptica, la plasticidad sináptica y la coordinación del accionar de varios grupos neuronales (Descarries *et al.*, 1997; Lendvai y Vizi, 2008; Picciotto *et al.*, 2012). Varios hallazgos estructurales y funcionales permiten inferir el rol de la ACh como neuromodulador en el SNC. Por un lado, la ACh es liberada al medio extracelular desde neuronas colinérgicas cuyos terminales en su mayoría no establecen contactos sinápticos (89-93 %), y que presentan sitios extrasinápticos de liberación de NT, como las varicosidades a lo largo del axón, donde se acumulan las vesículas con NT (Descarries *et al.*, 1997; Lendvai y Vizi, 2008). Además, los receptores de ACh generalmente se encuentran en sitios extrasinápticos, incluyendo localizaciones presinápticas o perisinápticas (Descarries *et al.*, 1997; Lendvai y Vizi, 2008). También se encuentran en localizaciones

postsinápticas, fundamentalmente en sinapsis glutamatergicas o GABAérgicas (Fabian-Fine *et al.*, 2001; Bürli *et al.*, 2010). Por último, la ACh liberada de forma extrasináptica no es degradada tan rápidamente ni por completo como ocurre en la hendidura sináptica (Lendvai *et al.*, 2013). Esto permite que persista el NT en el medio extracelular en baja concentración (0,1-2,0 μM) posibilitando la activación de receptores de alta afinidad. Además, la colina resultante de la escisión de la ACh también puede actuar como agonista de algunos receptores de ACh (Dani y Bertrand, 2007).

2.2. Receptores de acetilcolina

Los receptores de ACh pueden ser **metabotrópicos**, denominados receptores muscarínicos de ACh, o **ionotrópicos**, denominados receptores nicotínicos de ACh (nAChR) (Figura 4). Ambas clases de receptores presentan diferentes subtipos y son capaces de mediar tanto transmisión sináptica como extrasináptica.

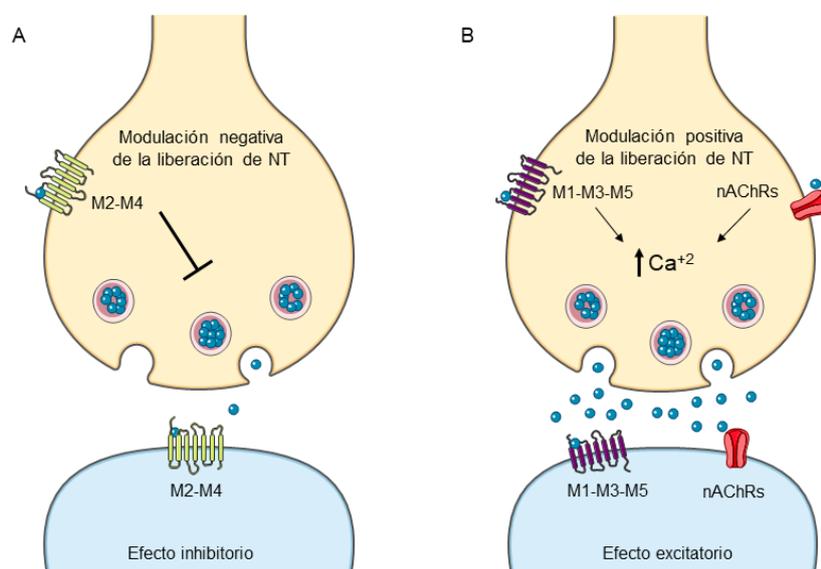


Figura 4. Receptores de ACh en el SNC y sus efectos según su localización presináptica o postsináptica. A- Receptores muscarínicos M2 y M4. **B-** Receptores nicotínicos y muscarínicos M1, M3 y M5.

2.2.1. Receptores muscarínicos

Los receptores muscarínicos en el SNC incluyen los subtipos M1, M3 y M5 acoplados a proteínas Gq, y los subtipos M2 y M4 acoplados a proteínas Gi/o. Ambos pueden presentar localizaciones postsinápticas o presinápticas. Los receptores M1, M3 y M5 postsinápticos median un efecto excitatorio de la ACh en la neurona postsináptica, mientras que al estar localizados en terminales presinápticos favorecen la liberación de NT. Los receptores M2 y M4 postsinápticos median un efecto inhibitorio de la ACh en la neurona postsináptica y al estar localizados en el terminal presináptico disminuyen la liberación de NT.

2.2.2. Receptores nicotínicos

Los nAChRs son canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGICs) permeables a cationes. Si bien los receptores ionotrópicos suelen estar más asociados a la transmisión sináptica rápida, los nAChRs median mayoritariamente neuromodulación a nivel del SNC. Cuando se encuentran localizados de forma postsináptica incrementan la excitabilidad neuronal y favorecen la potenciación a largo plazo. Al presentar localización presináptica en distintas neuronas favorecen la liberación de NT tales como GABA, Glu, dopamina, 5-HT, norepinefrina y ACh. Existen diferentes subtipos de nAChRs con localizaciones específicas, siendo los receptores neuronales **homoméricos $\alpha 7$** y **heteroméricos $\alpha 4\beta 2$** los más abundantes y ampliamente distribuidos en el encéfalo.

El presente trabajo de tesis aborda el estudio de la función molecular de los **receptores nicotínicos $\alpha 7$ neuronales**, por lo cual, en adelante la introducción se enfoca puntualmente en las bases estructurales y moleculares del funcionamiento de los nAChRs, haciendo hincapié en los subtipos mayoritarios del SNC, particularmente en los receptores $\alpha 7$ homoméricos.

3. RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

3.1. Estructura

Los nAChRs son pLGICs que pertenecen a la superfamilia de **receptores *Cys-loop***, cuyo nombre deriva de la presencia de un *loop* de 13 aminoácidos delimitado por un puente disulfuro entre dos cisteínas. Además, la familia incluye a receptores ionotrópicos de otros NT, como GABA, Gly y 5-HT. Los nAChRs son **receptores pentaméricos**, constituidos por el ensamblaje de cinco subunidades transmembranales que se distribuyen delimitando un poro central permeable al paso de cationes (Na^+ , K^+ y de forma variable a Ca^{2+}) (Figura 5) (Taly *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2010).

Se han identificado genes que codifican 17 **subunidades** de receptor nicotínico en el genoma de vertebrados, pero únicamente 16 subunidades se expresan en mamíferos (la subunidad $\alpha 8$ sólo fue detectada en aves). Se estima que dichos genes progresivamente divergieron por duplicación y mutaciones a partir de un ancestro común. Las subunidades denominadas **α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$)** se caracterizan por la presencia de dos residuos de cisteína adyacentes que forman un puente disulfuro en el sitio de unión del agonista ortostérico. Las subunidades **no α ($\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ , ϵ)** carecen de dichas cisteínas consecutivas (Taly *et al.*, 2009; Hurst *et al.*, 2013; Papke, 2014).

Teniendo en cuenta las subunidades que componen el pentámero, existen **receptores homoméricos**, constituidos por cinco subunidades idénticas, y **receptores heteroméricos**, conformados por dos o más subunidades diferentes. De los genes mencionados, 5 codifican subunidades del receptor heteromérico nicotínico muscular: $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ y ϵ . Los restantes 12 genes

codifican subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ que se expresan en sistema nervioso y en algunas células no neuronales, como células endócrinas, epiteliales, gliales e inmunes (Sharma y Vijayaraghavan, 2002).

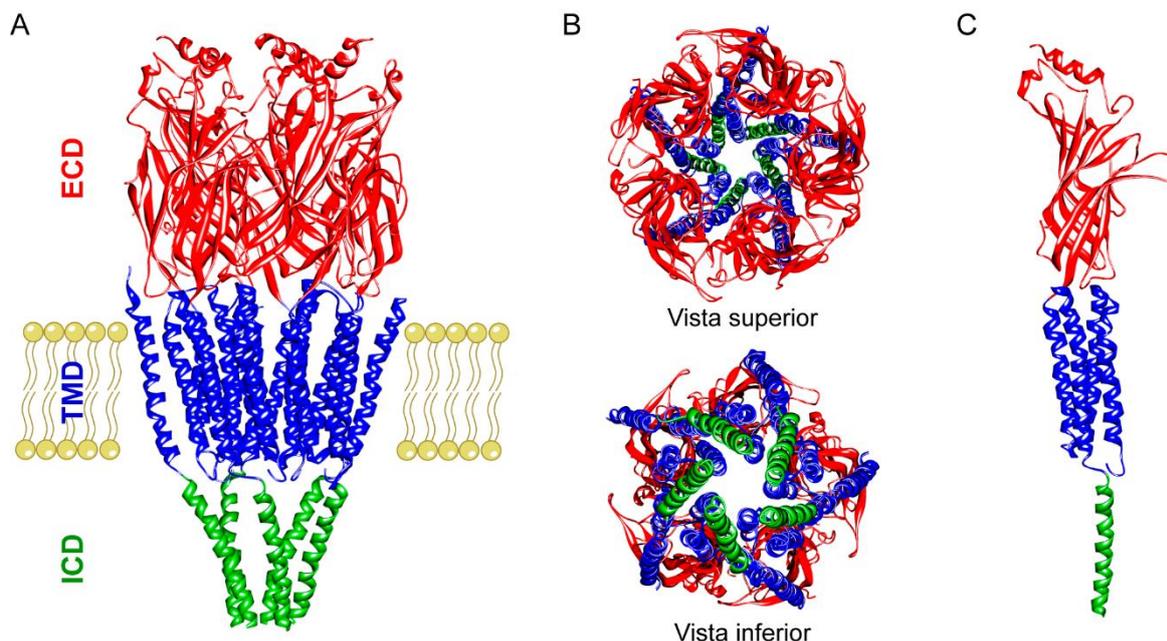


Figura 5. Estructura del nAChR. A- Vista lateral del receptor mostrando los tres dominios estructurales (modelo basado en la estructura cristalina del nAChR de *Torpedo marmorata*, PDB: 2BG9, (Unwin, 2005)). B- Vistas superior e inferior del receptor pentamérico. C- Vista lateral de una subunidad individual.

Algunas **subunidades α** , específicamente $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$, son capaces de formar **receptores homoméricos**. La subunidad $\alpha 7$ conforma los **receptores homoméricos $\alpha 7$** , uno de los subtipos mayoritarios en el SNC, aunque también puede formar **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$** en menor proporción (Liu *et al.*, 2009, 2012; Moretti *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). La subunidad $\alpha 8$ sólo se expresa en aves asociándose en homopentámeros. La subunidad $\alpha 9$ genera receptores homoméricos $\alpha 9$ o heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$ en células epiteliales del oído interno (Elgoyhen *et al.*, 2001; Sgard *et al.*, 2002). La subunidad $\alpha 10$ de mamíferos es incapaz de formar receptores homoméricos funcionales, pero se han detectado homopentámeros funcionales expresando la subunidad aviar en sistemas de expresión heterólogos (Lipovsek *et al.*, 2012).

Las restantes subunidades sólo pueden formar **receptores heteroméricos** constituidos por diferentes combinaciones de **subunidades α** ($\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\alpha 6$) con **subunidades β** ($\beta 2$ - $\beta 4$), como por ejemplo el receptor nicotínico neuronal $\alpha 4\beta 2$. Las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$ constituyen **subunidades accesorias o estructurales** que por sí solas no forman receptores funcionales porque no contribuyen con los sitios principales de unión del agonista, aunque pueden incorporarse para completar pentámeros funcionales con otras subunidades y aportar sitios de unión no ortodoxos, donde el agonista se une modulando la activación del receptor desde los sitios ortodoxos (Corringer *et al.*, 2000; Taly *et al.*, 2009; Hurst *et al.*, 2013; Zoli *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2016). La subunidad $\alpha 10$ si bien no

forma receptores homoméricos en mamíferos, no es considerada una subunidad estructural porque aporta sitios de unión de agonista funcionales en el receptor heteromérico $\alpha 9\alpha 10$ (Boffi *et al.*, 2017; Zouridakis *et al.*, 2019).

El diferente arreglo o combinación de subunidades determina los distintos subtipos de nAChRs con sus **estequiometrías** específicas, lo que les confiere propiedades farmacológicas, cinéticas y de permeabilidad particulares (Millar y Gotti, 2009). Cada subunidad de receptor nicotínico posee entre 400-500 aminoácidos distribuidos en tres dominios: un **dominio extracelular** (ECD, *Extracellular Domain*), un **dominio transmembrana** (TMD, *Transmembrane Domain*) y un **dominio intracelular** (ICD, *Intracellular Domain*) (Figura 5).

3.1.1. Dominio extracelular

La estructura terciaria del ECD de cada subunidad se compone de una hélice α corta en el extremo N-terminal, seguida por un total de 10 láminas u hojas plegadas β en conformación β -sándwich (Figuras 5 y 6A). Las láminas β en este tipo de conformación son antiparalelas y opuestas, distinguiéndose láminas internas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 8$) y externas ($\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 9$ y $\beta 10$) según sean proximales o distales al eje central del pentámero. Las hojas plegadas β se conectan entre sí mediante *loops*, numerados del 1 (hélice α a lámina $\beta 1$) al 10 (láminas $\beta 9$ - $\beta 10$). El *loop 7*, que une las láminas $\beta 6$ y $\beta 7$, constituye el denominado “*Cys-loop*” que da el nombre a la superfamilia de receptores. La hoja plegada $\beta 10$ se continúa con el inicio del primer segmento transmembrana (Thompson *et al.*, 2010).

El ECD del receptor pentamérico contiene el **sitio de unión ortostérico**, que se define como el sitio donde se une el agonista o ligando que produce la activación en forma endógena, en este caso, la ACh. El sitio de unión ortostérico del agonista es una cavidad o bolsillo que se genera en la interfaz entre los ECD de dos subunidades adyacentes, a aproximadamente 40 Å por encima de la superficie de la membrana plasmática. Cada subunidad aporta al sitio ortostérico una cara, conformada por tres **loops** o segmentos de aminoácidos: los **loops A, B y C** constituyen la **cara principal** o “+” y los **loops D, E y F** constituyen la **cara complementaria** o “-” (Corringer *et al.*, 2000; Sine, 2002; Taly *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2010) (Figura 6A). La cara principal del sitio de unión ortostérico es siempre aportada por una subunidad de tipo α , ya que posee las cisteínas adyacentes unidas por puente disulfuro en el *loop C*, esencial para la unión del agonista. La cara complementaria puede aportarla cualquier subunidad, ya sea α o no α . Por ejemplo, en los receptores homoméricos $\alpha 7$ existen cinco sitios ortostéricos de interfaz $\alpha 7/\alpha 7$, mientras que en los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ se forman sitios ortostéricos en interfaces $\alpha 4/\beta 2$ (Figura 6C).

Se estima que el receptor *Cys-loop* ancestral fue homomérico y con cinco sitios ortostéricos idénticos para la unión de agonistas. Sin embargo, el curso de la evolución condujo a la aparición de nuevas subunidades que perdieron la habilidad de formar sitios funcionales en una o ambas caras,

dando lugar al surgimiento de receptores heteroméricos con menos de cinco sitios ortostéricos disponibles y diversificando las propiedades farmacológicas. La mayoría de los receptores *Cys-loop* actuales logran activar con dificultad con un solo sitio ortostérico ocupado por el agonista, requiriendo la ocupación de dos o tres sitios para su máxima activación. Contrariamente, para el receptor $\alpha 7$ se demostró que un único sitio ortostérico ocupado por el agonista es suficiente para mediar la máxima activación, lo cual resulta propicio para su rol en los mecanismos de transmisión extrasináptica (Andersen *et al.*, 2013).

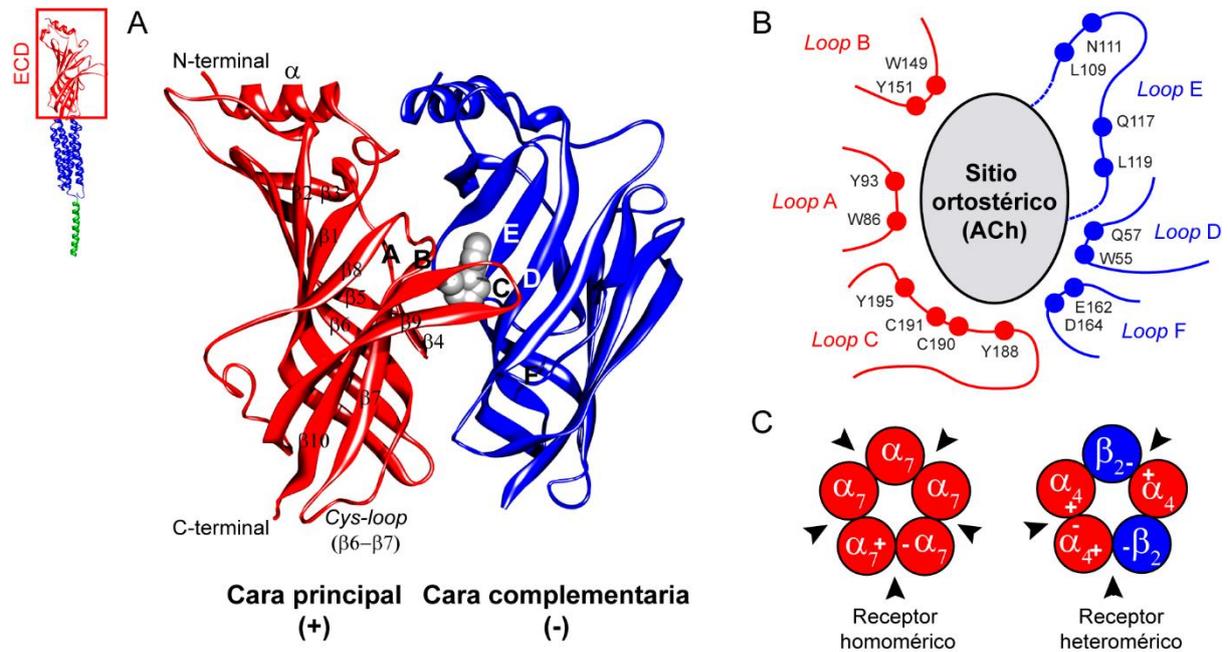


Figura 6. Dominio extracelular de los nAChRs. **A-** Se muestra un modelo de interfaz entre los ECD de dos subunidades de receptor nicotínico basado en la estructura cristalina de un complejo de AChBP (*ACh binding protein*) de *Lymnaea stagnalis* con el ligando ortostérico nicotina (PDB: 1UW6, (Celie *et al.*, 2004)). La subunidad en color rojo es la que aporta la cara principal del sitio ortostérico (*loops* A, B y C). También se indican la hélice α , las láminas β y el *Cys-loop*. La subunidad en color azul aporta la cara complementaria del sitio ortostérico (*loops* D, E y F). **B-** Diagrama del sitio ortostérico de unión de la ACh en el nAChR $\alpha 7$, resaltando los residuos que interaccionan con el agonista. **C-** Esquema de los nAChRs homoméricos y heteroméricos mayoritarios en el SNC, indicando con flechas las interfaces donde se forman sitios ortostéricos funcionales ($\alpha 7/\alpha 7$ y $\alpha 4/\beta 2$) y no ortodoxos ($\alpha 4/\alpha 4$).

La localización exacta de cada *loop* varía ligeramente entre las diferentes subunidades, dado que no se han resuelto las estructuras tridimensionales para todas ellas. En términos de estructura, los *loops* A, B, C y F son efectivamente “*loops*”, mientras que los *loops* D y E son segmentos de láminas plegadas β (Nemecz *et al.*, 2016) (Figura 6A). La cavidad de unión queda delimitada por residuos que mantienen la estructura del bolsillo posibilitando los cambios conformacionales subsecuentes a la unión del ligando y por algunos residuos aromáticos e hidrofóbicos que participan activamente interaccionando con el ligando ortostérico (Sine, 2002; Thompson *et al.*, 2010; DaCosta y Baenziger, 2013) (Figura 6B). Por comparación de secuencias entre las distintas subunidades de receptor

nicotínico se observa una alta conservación de los residuos de los *loops* A, B, C y D, mientras que para el *loop* E los aminoácidos resultan más variables. El *loop* F presenta aminoácidos conservados en las subunidades α , δ , ϵ y γ , pero no así en las subunidades β (Corringer *et al.*, 2000). Mutaciones puntuales en los residuos esenciales para la unión del agonista pueden dificultar o incluso inhabilitar a la subunidad para aportar una cara funcional al sitio ortostérico, impidiendo así la activación del receptor. Por ejemplo, los residuos Y188 (*loop* C) y W55 (*loop* D) al ser mutados a treonina (T) inactivan las caras principal y complementaria de la subunidad $\alpha 7$ respectivamente (Figura 6B).

3.1.2. Dominio transmembrana

El TMD de cada subunidad de receptor nicotínico se compone de cuatro hélices α que atraviesan perpendicularmente la membrana plasmática, denominadas segmentos o hélices M1, M2, M3 y M4. En el receptor pentamérico, las 20 hélices α totales se disponen en un **anillo interno** que delimita el **poro iónico**, formado por los segmentos **M2** de las cinco subunidades, y un **anillo externo** que protege las hélices M2 del contacto con los lípidos de la membrana, formado por los segmentos **M1, M3 y M4** de las cinco subunidades. El segmento M4 es el más distal al poro central, y por lo tanto, el que establece mayor contacto con los lípidos, mientras que M1 y M3 quedan dispuestos en una localización intermedia entre M2 y M4 (Miyazawa *et al.*, 2003; Taly *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2010) (Figura 7A-B). Los segmentos TMD parecen tener un rol importante en la oligomerización de las subunidades para formar el receptor pentamérico, ya que los TMD aislados interactúan espontáneamente formando rosetas pentaméricas (Nemecz *et al.*, 2016). Además, la interacción directa del segmento M4 con la membrana le permite al receptor detectar el ambiente lipídico que lo rodea, influenciando sus propiedades funcionales (DaCosta y Baenziger, 2009).

El **poro iónico** está delimitado por las hélices **M2** de las cinco subunidades, de modo que las paredes del canal iónico quedan conformadas por anillos pentaméricos de aminoácidos, generalmente homólogos, superpuestos de forma sucesiva y estratificada. Se ha establecido un modelo de organización estructural y funcional del canal iónico para los pLGICs constituido por **anillos externos, hidrofóbicos, polares, intermedios e internos**. Las posiciones de dichos residuos de M2 se enumeran desde 0'-20', partiendo de un aminoácido con carga positiva conservado en la porción citoplasmática que se corresponde con una lisina (K0') en la subunidad $\alpha 7$ (Corringer *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2010; Nemecz *et al.*, 2016) (Figura 7C). El canal se inicia con un **anillo externo o extracelular** en 20', generalmente de residuos polares, como el glutamato en $\alpha 7$ (E20'). Los anillos polares con carga negativa facilitan la atracción electrostática de los cationes en los receptores permeables a los mismos, como es el caso de los nAChRs. Luego el poro es continuado por una serie de anillos hidrofóbicos en las posiciones 16', 13' y 9' que contienen principalmente residuos de leucina altamente conservados (L16', V13' y L9' en $\alpha 7$). Esta región conformada por los **anillos hidrofóbicos** se define como la

compuerta o **gate de activación** del canal iónico, ya que constituye una barrera estérica en cierta medida, pero fundamentalmente una barrera energética por la alta hidrofobicidad que impide el pasaje de iones hidratados (diámetro promedio para Na^+ y K^+ de $\sim 8 \text{ \AA}$) y deshidratados (Beckstein y Sansom, 2006). El estrechamiento o constricción es máximo en esta zona del poro iónico debido a las marcadas interacciones hidrofóbicas que se establecen entre los residuos apolares de las cinco hélices. Tras la compuerta se encuentran nuevamente **anillos polares**, en la posición 6' con residuos de treonina o serina (T6' en $\alpha 7$) y en la posición 2' con residuos más variables (S2' en $\alpha 7$). Al inicio de la hélice M2, se encuentra un **anillo intermedio** en posición -1' seguido por un **anillo interno** en posición -4', que forma parte del *loop* citoplasmático que une los segmentos M1-M2. Esta porción final del poro iónico constituye el **filtro de selectividad del canal**, ya que en receptores catiónicos como los nAChRs, los anillos internos o citoplasmáticos presentan residuos cargados negativamente como glutamato y aspartato, que forman complejos transitorios con los cationes para sustituir parcialmente a las moléculas de agua que los hidrataban (E-1' y D-4' en $\alpha 7$). De este modo, disminuyen la barrera energética para la translocación efectiva de los cationes a través del poro iónico (Taly *et al.*, 2009). Además, recientemente se ha determinado la existencia de una **compuerta** o **gate de desensibilización** que se ubica en esta porción citoplasmática del poro iónico (*loop* M1-M2 e interfaz intracelular de M2-M3), junto al filtro de selectividad (Gielen *et al.*, 2015; Gielen y Corringer, 2018).

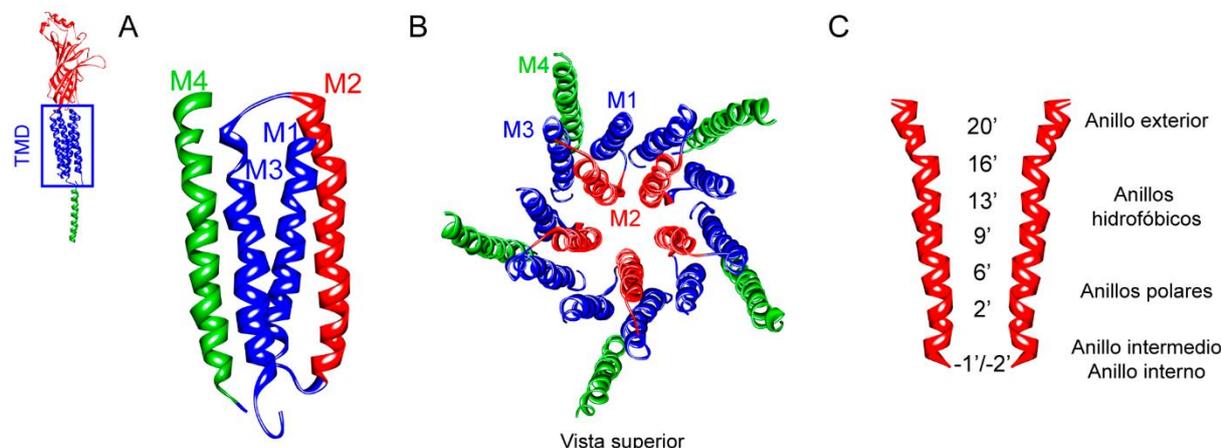


Figura 7. Dominio transmembrana de los nAChRs. A- Vista lateral de las cuatro hélices transmembrana M1, M2, M3 y M4 de una subunidad de receptor nicotínico. B- Vista superior del TMD del receptor pentamérico. Se distingue un anillo interno delimitado por M2 que forma el poro o canal iónico central y un anillo externo que lo separa del entorno lipídico, dado por M1 y M3 en la posición intermedia, y M4 en la posición más distal al poro. C- Esquema de los anillos de residuos homólogos de M2 que conforman el poro iónico del nAChR (por razones de claridad se muestran sólo dos hélices M2 en vista lateral).

La **interfaz entre el ECD y el TMD** representa una zona de transición estructural entre las láminas plegadas β de la porción extracelular y las hélices α de la porción transmembrana del receptor. Esta zona de transición o interfaz está constituida por una serie de **loops** que median la conexión funcional entre las distintas estructuras secundarias de ambos dominios. Los **loops** aportados por el ECD

incluyen: *loop* 2 (β 1- β 2), *loop* 7 o *Cys-loop* (β 6- β 7), *loop* 9 o *loop* F (β 8- β 9) y el extremo final de la lámina β 10. Los *loops* aportados por el TMD incluyen: el segmento pre-M1 (que se continúa de la lámina β 10 extracelular), el *loop* M2-M3 y el extremo C-terminal posterior a la hélice M4. Esta red de *loops* que median la transición o interfaz entre el ECD y el TMD también recibe la denominación de “**región de acoplamiento**” porque acopla los cambios estructurales que tienen lugar en el ECD como consecuencia de la unión del ligando, con los cambios estructurales que se dan en el poro iónico para posibilitar su apertura, y por ende, la activación del canal (Bouzat *et al.*, 2004, 2008; Thompson *et al.*, 2010; Bouzat, 2012; Nemezc *et al.*, 2016).

3.1.3. Dominio intracelular

El ICD de cada subunidad de receptor nicotínico está dado por el *loop* o **segmento M3-M4**, cuya estructura no ha sido completamente resuelta, con excepción de dos **hélices α** denominadas **MX** y **MA** (Figura 8A). La hélice MX se encuentra a continuación del segmento M3 y su estructura ha sido resuelta en el cristal del receptor α 4 β 2 (Morales-Perez *et al.*, 2016). La hélice MA se encuentra previa al segmento M4 y aunque su estructura no se observa en el cristal del receptor α 4 β 2, ha sido resuelta por cristalografía en el receptor nicotínico de *Torpedo marmorata* (Unwin, 2005). Igualmente, estructuras cristalográficas de otros receptores *Cys-loop* como el de serotonina tipo 3A de ratón (5-HT₃A) muestran en el ICD ambas hélices MX y MA (Hassaine *et al.*, 2014).

Si bien la estructura del *loop* M3-M4 no está completamente resuelta, se estima que las hélices **MA** de las cinco subunidades forman un cono pentagonal invertido a nivel intracelular, dejando cinco potenciales **espacios, ventanas o portales** entre subunidades por los cuales pasarían obligatoriamente los iones que atravesaron el canal iónico (Figura 8B). La superficie que enmarca dichos portales contiene residuos cargados negativamente y el tamaño de la ventana es de aproximadamente 8 Å, similar al de los iones Na⁺ y K⁺ hidratados. Esto garantiza el paso selectivo de los cationes a su través, a la vez que repele e impide el paso de aniones o iones de mayor tamaño (Unwin, 2005; Thompson *et al.*, 2010).

Además, la hélice MA tiene un rol preponderante en la **conductancia** del canal iónico, tanto para los nAChRs como para el receptor de serotonina 5-HT₃, habiéndose realizado los primeros estudios sobre este último receptor (Kelley *et al.*, 2003; Hales *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2010). Las subunidades del receptor de serotonina tipo A forman canales homoméricos de muy baja conductancia (< 1 pS) cuyas corrientes unitarias no pueden ser resueltas por técnicas electrofisiológicas, mientras que, al combinarse con subunidades tipo B, la conductancia del canal aumenta considerablemente (9-17 pS) permitiendo su detección en registros de canal único (Thompson *et al.*, 2010). Es así que, comparando las secuencias de ambas subunidades, se identificaron tres aminoácidos presentes en la hélice MA del ICD responsables de las diferencias observadas en la conductancia. La subunidad de **baja conductancia**

o LC (*Low Conductance*) presenta tres argininas (R), mientras que la subunidad de **alta conductancia** o HC (*High Conductance*) presenta tres residuos polares y/o cargados negativamente. Reemplazando los tres residuos de R en la subunidad LC por los tres residuos homólogos de la subunidad HC, se logran obtener subunidades tipo A HC, cuyas corrientes unitarias pueden ser detectadas (Kelley *et al.*, 2003). En el caso del receptor nicotínico homomérico $\alpha 7$, los tres residuos homólogos del ICD que determinan la conductancia son aminoácidos polares y/o con carga negativa (S436, E432, Q428), por lo tanto, las **subunidades $\alpha 7$ salvajes son HC** (Figura 8C). Cabe destacar que la conductancia de los distintos receptores *Cys-loop*, y particularmente de los nAChRs, no está exclusivamente determinada por los tres residuos del ICD, sino que otros dominios estructurales del receptor también ejercen su influencia, como por ejemplo el ECD (Hansen *et al.*, 2008).

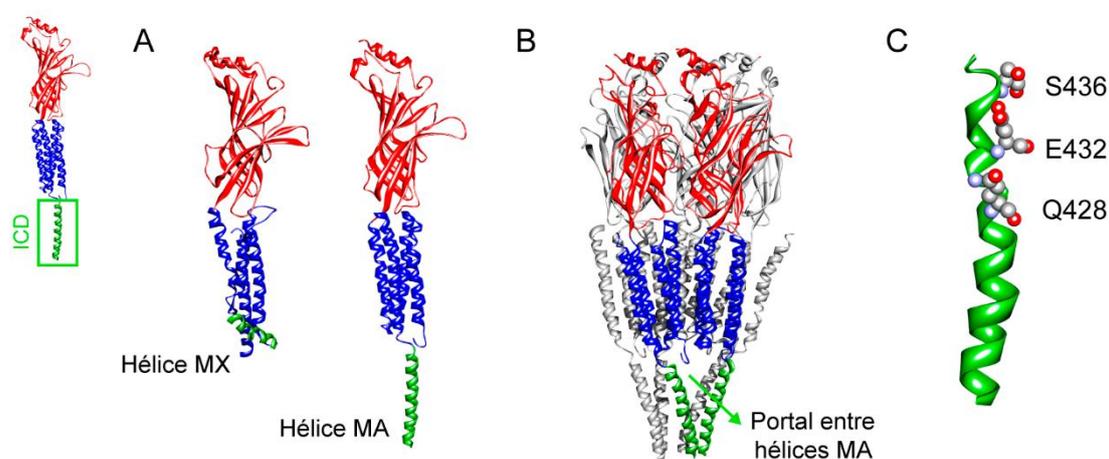


Figura 8. Dominio transmembrana de los nAChRs. A- Vista lateral de la subunidad $\alpha 4$ mostrando la hélice intracelular MX (PDB: 4KXI, (Morales-Perez *et al.*, 2016)) a la izquierda y de la subunidad $\alpha 1$ mostrando la hélice intracelular MA (PDB: 2BG9, (Unwin, 2005)) a la derecha. B- Se muestra uno de los portales intracelulares para el paso de cationes formado entre dos hélices MA de subunidades adyacentes. C- Determinantes de conductancia presentes en la hélice MA para el nAChR $\alpha 7$, responsables de la alta conductancia de esta subunidad.

El ICD también es un blanco importante en la **modulación intracelular** del receptor, pues interacciona con distintas proteínas y moléculas intracelulares, controlando no sólo su ensamblaje y transporte a membrana, sino también la actividad del receptor por interacción con proteínas $G_{\beta\gamma}$ y por procesos de fosforilación-desfosforilación a través de proteínas quinasas y fosfatasa que regulan los niveles de expresión del receptor, su desensibilización e interacción con el citoesqueleto (Cho *et al.*, 2005; Kuo, 2005; Kracun *et al.*, 2008; King *et al.*, 2015; Nemezc *et al.*, 2016; Elnagar *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha determinado que un acortamiento considerable del *loop* citoplasmático no impide el ensamblaje y funcionamiento del receptor, aunque puede generar ciertos cambios en sus propiedades (Valor *et al.*, 2002; Tsetlin *et al.*, 2011; Baptista-Hon *et al.*, 2013). Además, los pLGICs procariotas presentan un segmento M3-M4 reducido, lo cual sugiere que dicho dominio no

resulta indispensable para la expresión y/o funcionamiento de los receptores (Hilf y Dutzler, 2008; Bocquet *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2010).

3.2. Mecanismo funcional de transducción de señal: transiciones alostéricas

Los nAChRs, al igual que los restantes pLGICs, son proteínas que al unir el NT (agonista) permiten la transducción o conversión de esa “señal química” unida al sitio ortostérico del ECD, en una “señal eléctrica”, a través de la apertura de un canal o poro iónico en el TMD que permite el pasaje de cationes. El **mecanismo de transducción de señal** que “conecta” sitios topográficamente distintos y diversos dentro de la proteína receptora implica un cambio conformacional global del receptor, denominado “**transición alostérica**” (Taly *et al.*, 2009).

Se han propuesto dos **modelos** principales para explicar el mecanismo molecular por el cual ocurren las transiciones alostéricas:

- **Modelo secuencial o de ajuste inducido** (“KNF”, (Koshland *et al.*, 1966)): implica cambios conformacionales progresivos del receptor inducidos por la unión del ligando, excluyendo cualquier cambio conformacional de la proteína en ausencia del mismo. En consecuencia, según este modelo, la conformación del receptor se adapta localmente a cada ligando y varía indefinidamente según la diversidad de su estructura. Este modelo ajusta cuantitativamente con datos fisiológicos del nAChR muscular, pero no permite explicar otras propiedades de los receptores como las aperturas espontáneas.

- **Modelo Monod-Wyman-Changeaux** (“MWC”, (Monod *et al.*, 1965)): propone que el receptor o proteína se organiza en oligómeros simétricos que espontáneamente experimentan transiciones alostéricas reversibles por cambios cooperativos en su estructura cuaternaria, preexistiendo dos o más estados conformacionales discretos y globales en equilibrio, aún en ausencia de ligando. El mecanismo de transducción de señal se daría por la estabilización selectiva de un estado conformacional particular al cual el ligando se une preferentemente, provocando un desplazamiento de la población mayoritaria de estados conformacionales discretos a partir de cambios en las barreras energéticas entre los mismos. Este modelo ajusta con datos experimentales y permite predecir las interacciones de diferentes ligandos con el receptor, las aperturas espontáneas y los efectos de ganancia de función de ciertas mutaciones en el receptor.

En los pLGICs, como es el caso de los nAChRs, las respuestas fisiológicas están mediadas por varios estados conformacionales discretos que, considerando el grado de afinidad por el ligando y la capacidad de conducir iones, pueden agruparse en líneas generales en tres grupos principales: **estado cerrado** o de **reposo**, **estado abierto** y **estado desensibilizado** (Figura 9). Pueden a su vez existir distintos subestados conformacionales cerrados, abiertos y desensibilizados, y las constantes de velocidad que rigen las transiciones entre las distintas conformaciones varían según la naturaleza

estructural del receptor (subunidades que lo componen y estequiometría) y del ligando (Changeux y Christopoulos, 2016).

El alto grado de conservación estructural entre los distintos pLGICs permite inferir mecanismos funcionales conservados. Por lo tanto, los datos a continuación se presentan de forma genérica para la superfamilia, puntualizando particularidades propias de los nAChRs descritas hasta el presente.

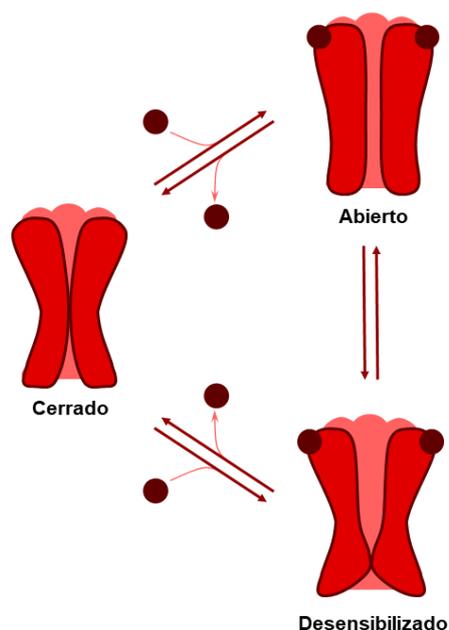


Figura 9. Modelo alostérico mínimo de estados conformacionales de los pLGICs. La unión del agonista estabiliza selectivamente los estados conformacionales abierto y desensibilizado. La compuerta de activación se observa cerrada en el estado cerrado (porción media del poro iónico) y abierta en los estados abierto y desensibilizado. La compuerta de desensibilización se observa cerrada en el estado desensibilizado (porción terminal o citoplasmática del poro iónico) y abierta en los estados abierto y cerrado.

3.2.1. Estado cerrado

Cuando el receptor se encuentra en el **estado cerrado** o de **reposo**, la afinidad por el ligando ortostérico es baja y la compuerta o *gate* de activación está cerrada, siendo un estado no conductor que impide el pasaje de iones (Figura 9). En las distintas estructuras cristalinas de los pLGICs con conformaciones de estado cerrado se puede observar la constricción a nivel de los anillos hidrofóbicos del segmento M2 que constituyen la compuerta de activación (Nemecz *et al.*, 2016).

3.2.2. Estados intermedios: *flipped* y *primed*

Se han identificado además **estados cerrados que unen el ligando con alta afinidad**, denominados **estados intermedios, pre-activos o parcialmente activados**. Estos median la transición entre las conformaciones cerrada y abierta tradicionales, ya que implicarían cambios conformacionales únicamente en el ECD donde se encuentra el sitio ortostérico de unión al ligando, sin que ocurran cambios conformacionales en el poro iónico, por lo cual el canal permanece cerrado. Fueron

propuestos dos mecanismos distintos para alcanzar estados conformacionales intermedios, recibiendo diferentes denominaciones: estados **“flipped”** (Lape *et al.*, 2008) y estados **“primed”** (Mukhtasimova *et al.*, 2009). En el caso de los estados *flipped*, se considera que el cambio conformacional en el sitio ortostérico que incrementa la afinidad por el ligando es concertado y simultáneo para todas las subunidades del receptor, por lo tanto, existe un solo estado *flipped* para cada receptor con un dado grado de unión de ligandos (Ej. receptor con un ligando *flipped*, receptor con dos ligandos *flipped*, etc.). En el caso de los estados *primed*, se considera que el cambio conformacional en el sitio ortostérico que incrementa la afinidad por el ligando ocurre en cada sitio entre subunidades independientemente de los otros sitios ortostéricos, por lo tanto, existen estados *primed*, doble *primed*, triple *primed* etc., para los receptores con distinto número de ligandos unidos (Ej. un receptor con dos ligandos puede estar en dos estados, *primed* o doble *primed*) (Sivilotti y Colquhoun, 2016).

3.2.3. Estado abierto: mecanismos moleculares de gatillado

El **estado abierto** o **activo** tiene alta afinidad por el ligando ortostérico y presenta el poro iónico abierto, siendo un estado conductor que permite el pasaje de iones (Figura 9). El ligando se une al receptor promoviendo el paso desde el estado cerrado a un estado intermedio o pre-activo, y a través de un proceso denominado **gatillado** o **“gating”** del canal, la unión del agonista deriva en la apertura de la compuerta o *gate* de activación dejando al receptor en estado abierto.

Estudios estructurales y computacionales recientes han permitido proponer un **modelo de gatillado del canal** consistente, dado por una secuencia u ola de eventos conformacionales que inician en el sitio ortostérico de unión del agonista, se propagan a la interfaz ECD-TMD o región de acoplamiento y continúan a nivel transmembrana para reordenar los segmentos del TMD hasta abrir la compuerta de activación del poro iónico (Grosman *et al.*, 2000; Purohit *et al.*, 2007; Calimet *et al.*, 2013; Sauguet *et al.*, 2014; Nemezc *et al.*, 2016). Este proceso ocurre a través de **dos transiciones alostéricas cuaternarias sucesivas**: inicialmente tiene lugar una contracción radial del ECD denominada **“(un)-blooming”**, por la semejanza a un proceso inverso al florecimiento, y posteriormente se produce el desenrollamiento o **“twisting”**, que consiste en la rotación concertada en sentido opuesto del ECD con respecto al TMD sobre el eje de simetría del receptor. Estos cambios conformacionales permiten mantener el canal en su estado abierto o activo (Figura 10) (Taly *et al.*, 2005; Hilf y Dutzler, 2008; Bocquet *et al.*, 2009; Calimet *et al.*, 2013; Althoff *et al.*, 2014; Sauguet *et al.*, 2014).

El proceso inicia con la **unión del agonista** al sitio ortostérico del ECD donde interacciona de forma directa con algunos residuos aromáticos e hidrofóbicos de los *loops* de las caras principal y complementaria (Figura 6A-B). Las fuerzas que estabilizan dicha unión incluyen interacciones catión- π , interacciones dipolo-catión, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals (Celie *et al.*, 2004;

Sine y Engel, 2006; Thompson *et al.*, 2010). El farmacóforo para el receptor nicotínico incluye un nitrógeno catiónico que interacciona con la cara principal y un aceptor de puente de hidrógeno que interacciona con la cara complementaria del sitio ortostérico (Xiu *et al.*, 2009; Blum *et al.*, 2013). Para la mayoría de los receptores *Cys-loop* se ha descrito la existencia de una interacción **catión- π** entre el ligando ortostérico endógeno y alguno de los residuos aromáticos de la cara principal (triptófano W, fenilalanina F, tirosina Y) (Xiu *et al.*, 2009). En el caso del nAChR $\alpha 7$, el residuo aromático Y93 del *loop* A forma la interacción catión- π con el nitrógeno cargado positivamente (catiónico) de la ACh (Puskar *et al.*, 2011). Aunque muchos agonistas sintéticos y exógenos, como la nicotina, pueden establecer interacciones catión- π , las mismas no resultan esenciales para activar al receptor. Sin embargo, su ausencia suele asociarse a una disminución en la potencia del agonista en cuestión (Xiu *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2010).

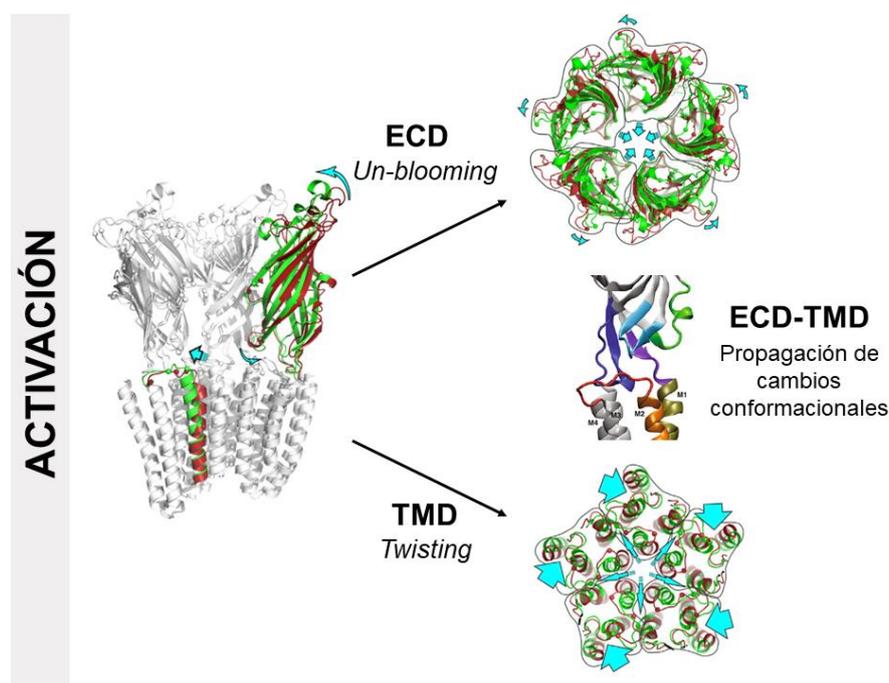


Figura 10. Cambios conformacionales durante la activación de los pLGICs (modificado de (Nemecz *et al.*, 2016)). Se muestran las estructuras cristalinas superpuestas del pLGIC de *Gloeobacter violaceus* (GLIC) en sus conformaciones cerrada (rojo) (PDB: 4NPQ (Sauguet *et al.*, 2014)) y abierta (verde) (PDB: 3EAM (Bocquet *et al.*, 2009) y PDB: 3EHZ (Hilf y Dutzler, 2009)). El proceso inicia con una contracción radial del ECD que se cierra sobre la molécula de agonista (*un-blooming*). Luego los cambios conformacionales del ECD son propagados hacia el TMD a través de la región de acoplamiento. Las hélices del TMD experimentan una rotación/inclinación (*twisting*) que deriva en la apertura de la compuerta de activación, permitiendo el pasaje de los iones a través del poro.

Como se mencionó previamente, la primera transición alostérica que tiene lugar una vez unido el ligando ortostérico implica el movimiento de cuerpo rígido de los ECD de las subunidades radialmente hacia eje central de simetría del pentámero y tangencialmente en sentido antihorario, generando un arreglo más compacto de la estructura β -sándwich (***(un)-blooming***) (Figura 10). En particular el *loop* C del sitio ortostérico exhibe la mayor movilidad al rotar hacia la cavidad cerrándose

sobre la molécula de agonista unida (Gao *et al.*, 2005; Law *et al.*, 2005; Taly *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Es posible que esta transición alostérica inicial se corresponda con el **estado conformacional intermedio** o **pre-activo**, ya que el receptor aún se encuentra en un estado cerrado, pero une al ligando con mayor afinidad al contraerse el ECD (Lape *et al.*, 2008).

Los cambios conformacionales en el ECD deben propagarse al TMD a través de la **interfaz ECD-TMD** o **región de acoplamiento** (Figura 10). Las evidencias experimentales indican principalmente un rol preponderante del *loop* β 1- β 2, *Cys-loop*, *loop* M2-M3 y segmento pre-M1, ya que actúan de forma concertada para acoplar la unión del agonista con la apertura del canal iónico (Kash *et al.*, 2003; Bouzat *et al.*, 2004, 2008; Grutter *et al.*, 2005; Lee y Sine, 2005; Jha *et al.*, 2007; Purohit y Auerbach, 2007; Bartos *et al.*, 2009; Taly *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2010; Bouzat, 2012). A partir de las transiciones conformacionales inferidas de las estructuras de otros pLGICs, es claro el movimiento hacia abajo del *loop* β 1- β 2 y los desplazamientos alejándose del eje central del poro por parte del *Cys-loop* y del ***loop* M2-M3**, cuyo movimiento genera una redistribución de las cadenas laterales de varios residuos del TMD (Hilf y Dutzler, 2008; Bocquet *et al.*, 2009; DaCosta y Baenziger, 2013; Nemezc *et al.*, 2016).

Es así que la interfaz ECD-TMD acopla los cambios del ECD con la **rotación-inclinación concertada de las hélices α del TMD (*twisting*)** abriendo la compuerta de activación por desestabilización de las interacciones en los anillos hidrofóbicos de M2, de modo que el receptor alcanza la conformación de **estado abierto** y permite el pasaje de los iones (Figura 10). El canal se abre por la inclinación global de las hélices M2 junto con el segmento M3 y el *loop* M2-M3, mientras que los segmentos M1 y M4 se muestran comparativamente más fijos y menos flexibles (Miyazawa *et al.*, 2003; Law *et al.*, 2005; Paas *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006, 2007; Hilf y Dutzler, 2008; Nemezc *et al.*, 2016).

3.2.4. Estado desensibilizado

A partir del estado conformacional abierto o activo con el ligando ortostérico unido, el receptor puede experimentar una transición hacia estados no conductores por dos procesos diferentes: **desactivación** y **desensibilización**. El proceso de **desactivación** implica la disociación del ligando unido, de modo que el receptor retorna al **estado conformacional cerrado** (Figura 9). Se favorece ante bajas concentraciones del agonista, tiempos cortos de exposición al mismo y cuando el receptor tiene baja afinidad por el ligando, por lo cual la disociación es rápida. Por el contrario, ante concentraciones elevadas del agonista o tiempos prolongados de exposición al mismo, ocurre el proceso de **desensibilización**, donde el receptor experimenta una transición desde el estado abierto al **estado desensibilizado**. Este estado conformacional mantiene el ligando unido en el sitio ortostérico con alta afinidad, pero no permite el pasaje de iones, siendo también un estado no conductor (Figura 9).

Entre los pLGICs, la cinética de desensibilización es bastante variable, pero en general se considera multifásica, con al menos dos estados conformacionales desensibilizados (rápido y lento). La **velocidad de desensibilización** macroscópica puede ser estimada experimentalmente por la velocidad de decaimiento de las corrientes macroscópicas, y como exhibe un incremento lineal con la probabilidad de apertura del receptor, se considera que la desensibilización tiene lugar a partir del receptor activado por el máximo número posible de ligandos. Tras la remoción del ligando, se puede evaluar la **cinética de recuperación de la desensibilización**, donde primero se disocia el agonista del receptor desensibilizado y luego este último experimenta una serie de cambios conformacionales hasta retornar al estado cerrado o de reposo. Inicialmente se consideró una transición directa desde el estado desensibilizado al cerrado, pero no se descarta un paso obligatorio por un estado conformacional abierto en ausencia de ligando, con aperturas breves no detectables por técnicas electrofisiológicas (Gielen y Corringer, 2018).

Las **bases estructurales del proceso de desensibilización** fueron inicialmente exploradas por estudios funcionales de mutagénesis, detectando distintas regiones del receptor involucradas en la desensibilización. A nivel del TMD, en la posición 9' de los anillos hidrofóbicos del segmento M2, mutaciones a residuos polares pequeños como treonina (T) o serina (S) prácticamente abolen la desensibilización en todos los pLGICs (L9'T en $\alpha 7$) (Revah *et al.*, 1991; Yakel *et al.*, 1993; Bianchi y Macdonald, 2001). También a nivel del ECD, la interfaz ECD-TMD y el ICD se han identificado residuos que intervienen y/o modulan la desensibilización (Quick y Lester, 2002; Hu *et al.*, 2006; Bouzat *et al.*, 2008; Wang y Lynch, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Es importante considerar que como el proceso de desensibilización ocurre subsecuente al proceso de activación por el ligando, cualquier mutación que afecte la cinética de activación también impactará en la cinética de desensibilización. Por esta razón, ciertos resultados sobre la influencia de algunas mutaciones en la desensibilización resultan ambiguos y/o controversiales (Gielen y Corringer, 2018).

Recientemente se han obtenido las **estructuras cristalinas** de receptores *Cys-loop* aniónicos y de sus quimeras en presencia de agonista en **estado desensibilizado** (Miller y Aricescu, 2014; Huang, Shaffer, *et al.*, 2017; Laverty *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2017). En los receptores desensibilizados se observa la compuerta de activación abierta y una constricción hidrofóbica al final del poro iónico, a nivel del filtro de selectividad, la cual sería responsable de impedir el pasaje de los iones conformando una **compuerta** o **gate de desensibilización** (Figura 9). Estudios funcionales utilizando distintas quimeras de receptores aniónicos (Gly, GABA) han revelado la importancia de la interacción entre el *loop* M1-M2 y el extremo intracelular de M3 en el proceso de desensibilización, identificándose residuos clave de la interfaz M2-M3 que al ser mutados incrementan considerablemente la desensibilización sin afectar la activación del canal (Gielen *et al.*, 2015). Es así que utilizando un bloqueador de canal abierto (picrotoxina), capaz de unirse a la zona -2'/2' del segmento M2 impidiendo

físicamente su constricción, se inhabilita la transición de los canales abiertos hacia el estado desensibilizado. Esto permite identificar la localización de la compuerta de desensibilización próxima al **extremo citoplasmático o intracelular del poro iónico** (Gielen *et al.*, 2015; Gielen y Corringer, 2018) (Figura 9).

La transición alostérica que conduce al estado conformacional desensibilizado también implica una reorganización estructural global del receptor subsecuente a la activación. A partir de diferentes estudios experimentales se ha identificado un movimiento del extremo superior de las hélices del TMD expandiendo el poro a ese nivel, a la vez que se genera una constricción en el extremo intracelular cerrando la compuerta de desensibilización, pero manteniendo abierta la compuerta de activación (Gielen y Corringer, 2018). Se estima que ese movimiento del extremo extracelular del TMD se desencadena junto con rearrreglos en la interfaz ECD-TMD (Bouzat *et al.*, 2008; Yamodo *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013), mientras que la conformación del ECD no se modifica sustancialmente, conservando la elevada afinidad por el agonista en los estados abierto y desensibilizado (Wang y Lynch, 2011).

Recientemente se ha resuelto la estructura cristalina del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado desensibilizado (Morales-Perez *et al.*, 2016), la cual se correlaciona con la conformación desensibilizada de los pLGICs aniónicos, pues muestra una disposición similar de las hélices del TMD y la constricción a nivel intracelular del poro iónico en posición -1' que constituye la compuerta de desensibilización. Sin embargo, para los pLGICs aniónicos la compuerta es de carácter hidrofóbico, mientras que en $\alpha 4\beta 2$ la constricción es hidrofílica y cargada negativamente. A su vez, las cadenas laterales de los residuos de ácido glutámico a ese nivel son dinámicas y con influencia en la conductancia, pudiendo rotar y ensanchar el diámetro del poro. Por lo tanto, no es posible explicar hasta el momento cómo un microambiente que favorece la atracción electrostática de los cationes y que puede expandir el diámetro del poro logra impedir efectivamente el pasaje de los iones (Gielen y Corringer, 2018). Por su parte, el ECD de $\alpha 4\beta 2$ desensibilizado muestra una conformación con un grado de contracción radial distinto al de las estructuras pLGIC aniónicas, lo cual puede deberse a diferencias intrínsecas en el proceso de *un-blooming* entre receptores aniónicos y catiónicos durante la activación; o bien a que las estructuras se correspondan con distintos subestados desensibilizados (Gielen y Corringer, 2018). En conclusión, si bien el mecanismo de desensibilización parece estar conservado entre los distintos pLGICs, aún se requiere de futuros estudios experimentales en receptores *Cys-loop* catiónicos para comprender las bases moleculares de la desensibilización en los nAChRs.

3.3. Subtipos de receptores nicotínicos: distribución y funcionalidad diferencial

En el encéfalo de mamíferos se expresan únicamente 9 subunidades de nAChRs ($\alpha 2-7$ y $\beta 2-4$) distribuidas en las distintas áreas formando diferentes subtipos de receptores funcionales (Figura 11A).

La **distribución anatómica** única de los subtipos de nAChRs dentro de una determinada red o circuito neuronal está íntimamente relacionada con su **rol fisiológico** consistente en modular la excitabilidad y la plasticidad de distintas funciones cerebrales. A su vez, los nAChRs desempeñan roles preponderantes en la fisiopatología de algunas enfermedades del SNC, tornándose **blancos farmacológicos** de interés en desórdenes neurológicos, neurodegenerativos y/o inflamatorios. Cada subtipo de nAChR presenta una composición y estequiometría de subunidades específica que define sus propiedades biofísicas y farmacológicas diferenciales. Los **subtipos mayoritarios en el SNC** son los **receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$** y los **receptores homoméricos $\alpha 7$** (Figura 11A-B).

El **receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$** constituye el subtipo más abundante en el SNC (~90 %) y ejerce su influencia en cognición, estado de ánimo, conciencia y dolor. Está asociado al tabaquismo, siendo un mediador clave en los efectos adictivos de la nicotina, y a desórdenes neurodegenerativos, depresión y epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante (Gotti y Clementi, 2004; Tapper *et al.*, 2004). Existen dos estequiometrías mayoritarias, con dos subunidades $\beta 2$ ($(\alpha 4)_2(\beta 2)_2^*$) (el asterisco* refiere a la quinta subunidad que puede ser $\alpha 4$ o $\alpha 5$) o tres subunidades $\beta 2$ ($(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$). Ambas estequiometrías difieren en la sensibilidad al agonista endógeno ACh, siendo $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ de baja sensibilidad por la presencia de una interfaz $\alpha 4/\alpha 4$ no ortodoxa, y $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ de alta sensibilidad (Benallegue *et al.*, 2013). Presentan otras propiedades diferenciales, como la cinética de activación y desensibilización, conductancia unitaria, permeabilidad al Ca^{+2} , modulación por Zn^{+2} , sensibilidad a la exposición crónica por nicotina y a otros agonistas exógenos. La estequiometría de alta sensibilidad exhibe menor permeabilidad al Ca^{+2} y menor velocidad de desensibilización respecto de la estequiometría con dos subunidades $\beta 2$ en el pentámero (Tapper *et al.*, 2004; Grupe *et al.*, 2015).

Contrariamente al receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$, el **receptor homomérico $\alpha 7$** exhibe una cinética de activación y desensibilización muy rápida, con una alta permeabilidad al Ca^{+2} (Bouzat *et al.*, 2018). Además, recientemente se ha demostrado la capacidad de las subunidades $\alpha 7$ de coensamblarse con subunidades $\beta 2$ para formar **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$** en el SNC, cuyo rol fisiológico y propiedades farmacológicas diferenciales aún no han sido dilucidados (Thomsen *et al.*, 2015). Dado que los receptores homoméricos poseen un origen evolutivo más ancestral que los receptores heteroméricos, la incorporación de subunidades $\beta 2$ en el pentámero de $\alpha 7$ debe haber impactado en la función molecular de dicho receptor durante la evolución, permitiéndole desempeñar la modulación de circuitos neuronales específicos, de acuerdo con su localización anatómica discreta. Es así que la **señalización colinérgica en el SNC** mediada por nAChRs heteroméricos y homoméricos exhibe un **patrón temporal y espacial distintivo**, dado por las **propiedades funcionales diferenciales** de cada subtipo de receptor (Figura 11B).

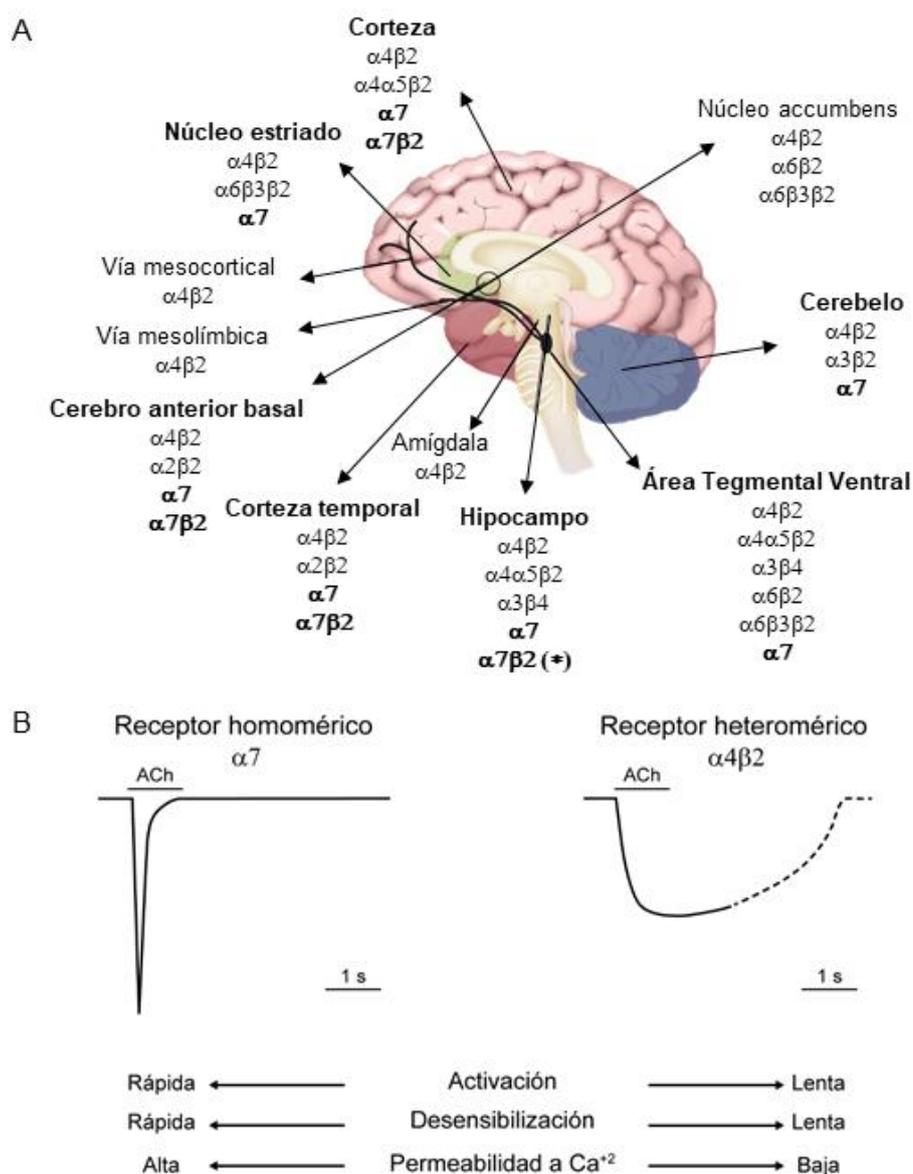


Figura 11. Subtipos de nAChRs en el SNC. A- Distribución anatómica de nAChRs en el encéfalo, resaltando en **negrita** la localización de los receptores que contienen subunidades $\alpha 7$. El (*) indica datos no concluyentes. Modificado de (Zoli *et al.*, 2015; Manetti *et al.*, 2018). B- Propiedades farmacológicas y funcionales diferenciales básicas de los nAChRs $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$, mostrando un esquema de corrientes macroscópicas representativas. Modificado de (Dineley *et al.*, 2015).

Por estas razones, el presente trabajo de tesis se focaliza en el estudio de la **función molecular de los nAChRs $\alpha 7$ homoméricos** clásicos y **heteroméricos** recientemente descubiertos, con el objetivo de dilucidar las bases moleculares de su activación y modulación diferencial e identificar sus propiedades funcionales distintivas con potencial impacto en los procesos de señalización colinérgica que median neuromodulación en el SNC. Por lo tanto, a continuación, la introducción se centra en los conocimientos disponibles hasta el presente sobre el **receptor $\alpha 7$ homomérico**, su activación y modulación por diferentes agentes farmacológicos, y su relevancia a nivel fisiológico y fisiopatológico.

4. RECEPTOR NICOTÍNICO NEURONAL $\alpha 7$

4.1. Generalidades

Al igual que los otros nAChRs neuronales, el **receptor $\alpha 7$ homomérico** presenta una localización subcelular variable (postsináptica, presináptica, perisináptica y extrasináptica), de modo tal que media mecanismos de transmisión sináptica clásica en algunos circuitos, pero principalmente ejerce su función en el **rol neuromodulador de la ACh** en el SNC. Interviene facilitando la **liberación presináptica de NT** (mayoritariamente de GABA y Glu, aunque también dopamina y norepinefrina); modulando la **excitabilidad de la neurona postsináptica**, ya sea al potenciar o contrarrestar el efecto de otros NT sobre sus receptores excitatorios e inhibitorios respectivamente; y mediando diversos procesos de señalización por **transmisión extrasináptica** (Fabian-Fine *et al.*, 2001; Hurst *et al.*, 2013; Lendvai *et al.*, 2013; Papke, 2014). Los datos filogenéticos indican que el gen que codifica para la subunidad $\alpha 7$ es un gen ancestral, ya que originariamente surgieron receptores pentaméricos homoméricos en organismos que dependían de otros tipos de comunicación intercelular, no necesariamente rápidos ni especializados como la transmisión sináptica química entre neuronas. Esto es consistente con el rol preponderante del receptor $\alpha 7$ en la transmisión extrasináptica, así como con su presencia en células no neuronales y no excitables, incluyendo células gliales, epiteliales e inmunes.

Además, $\alpha 7$ posee **propiedades cinéticas y farmacológicas** que resultan únicas y características de la actividad ionotrópica de este receptor, distinguiéndolo de los restantes subtipos de nAChRs. Presenta una **rápida activación** y una **rápida desensibilización**, y sus propiedades cinéticas son independientes de la concentración de agonista (Bouzat *et al.*, 2008). Dado que la duración de los episodios de activación es similar a la constante de velocidad de desensibilización (en el orden de los microsegundos), se ha postulado que el principal mecanismo por el cual el canal pasa desde el estado activo a un estado no conductor es la desensibilización, siendo este un proceso fácilmente reversible (Bouzat *et al.*, 2008). Por estas particularidades, **no existe un modelo cinético consensuado** para explicar los mecanismos moleculares de activación, desensibilización y potenciación del receptor $\alpha 7$, así como tampoco han sido detectados estados intermedios hasta el presente (Mike *et al.*, 2000; Papke *et al.*, 2000; McCormack *et al.*, 2010; Pesti *et al.*, 2014). Además, $\alpha 7$ alcanza su máxima activación por la unión de la ACh a un solo sitio ortostérico (Andersen *et al.*, 2013), presenta relativamente baja sensibilidad al agonista endógeno y a la nicotina, es completamente activado por la Ch y selectivamente bloqueado por la α -bungarotoxina (α -Bgt) (Zoli *et al.*, 2015).

Una de las propiedades más llamativas del receptor $\alpha 7$ es su elevada **permeabilidad al Ca^{+2}** , ya que posee la mayor relación permeabilidad a Ca^{+2} /permeabilidad a Na^{+} (~10-20) entre los nAChRs, siendo comparable a la de los receptores heteroméricos NMDA de Glu (Séguéla *et al.*, 1993; Albuquerque *et al.*, 1997; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004). El incremento intracelular de Ca^{+2} que

ocasiona la activación del receptor $\alpha 7$ proviene inicialmente del ingreso directo y transitorio a través del canal iónico, aunque la despolarización originada por el influjo de cationes también puede activar canales de Ca^{+2} operados por voltaje (VOCCs, *Voltage-Operated Calcium Channels*). Al ingreso extracelular de este ion se acopla la liberación de Ca^{+2} desde los reservorios intracelulares por receptores de rianodina e inositol trifosfato, lo que contribuye a la generación de señales de Ca^{+2} de larga duración (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Egea *et al.*, 2015; Guan *et al.*, 2015; Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat *et al.*, 2018; Kabbani y Nichols, 2018). De esta forma, gracias al incremento intracelular de Ca^{+2} , la activación rápida y transitoria de $\alpha 7$ se transforma en un evento sostenido a partir del cual se desencadenan otras **vías de señalización intracelulares** mediadas por ejemplo por MAPK/ERK, JAK2, Akt/PKB, PKC, AC, etc. Además, se ha determinado que el receptor $\alpha 7$ interacciona físicamente con diversas proteínas intracelulares, incluyendo la proteína JAK2 tras la estimulación con agonistas de $\alpha 7$ (Shaw *et al.*, 2002), proteínas quinasas de la familia Src como Fyn y Lyn (Wang *et al.*, 2004) y proteínas G (G_α y $G_{\beta\gamma}$) a través del ICD o *loop* M3-M4 (Nordman y Kabbani, 2012; Kabbani *et al.*, 2013; King *et al.*, 2015). Estas respuestas más sostenidas evocadas por el receptor $\alpha 7$ le permiten modular de forma efectiva los circuitos de memoria, cognición, recompensa, aprendizaje, etc., incluso mediando eventos de plasticidad sináptica por potenciación o depresión a largo plazo (Lendvai *et al.*, 2013).

Asimismo, el receptor $\alpha 7$ ejerce un importante rol de **neuroprotección**, a través de la promoción de **efectos antiinflamatorios** y **antioxidantes**. Particularmente la activación de la vía **JAK2-PI3K-Akt** ha sido identificada como uno de los mecanismos principales por los cuales el receptor $\alpha 7$ ejerce su rol neuroprotector, ya que promueve la expresión de factores antiapoptóticos e inhibe caspasas, favoreciendo la supervivencia celular (Kihara *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2002; Parada *et al.*, 2010; Tsoyi *et al.*, 2011; Grando, 2014; Navarro *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016). Incluso se observó su activación frente a situaciones de daño o injuria cerebral, como ocurre con la deprivación de oxígeno y glucosa (Lendvai *et al.*, 2013; Parada *et al.*, 2013). Asimismo, $\alpha 7$ ha sido detectado en la membrana externa de las mitocondrias de distintos tipos celulares y su activación allí también tiene efectos antiapoptóticos al bloquear la liberación del citocromo c (Gergalova *et al.*, 2012, 2014; Kalashnyk *et al.*, 2012; Lykhmus *et al.*, 2014). La activación de JAK2-PI3K-Akt además promueve la activación del factor de transcripción Nrf-2 asociado a la defensa celular frente al estrés oxidativo, siendo la enzima hemooxigenasa I (HO-1) uno de los principales efectores inducidos (Tsoyi *et al.*, 2011; Parada *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2015). En paralelo, al activarse JAK2 se produce la fosforilación y dimerización del factor de transcripción STAT3, que al translocar al núcleo favorece la respuesta antiinflamatoria. También impulsa la inhibición del factor de transcripción NF- κ B, ya que impide la fosforilación del inhibidor (I κ B) de modo que el complejo I κ B/NF- κ B persiste en el citoplasma y no se transloca al núcleo, reprimiendo la expresión de genes proinflamatorios (de Jonge *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2006; de Jonge y Ulloa,

2007; Zanetti *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2017) (Figura 12). Es así que $\alpha 7$ constituye un elemento clave no sólo a nivel periférico en la “vía antiinflamatoria colinérgica” (liberación de ACh desde el nervio vago hacia los macrófagos (Egea *et al.*, 2015)), sino también en vías antiinflamatorias colinérgicas cerebrales a través de la microglía (Stuckenholz *et al.*, 2013).

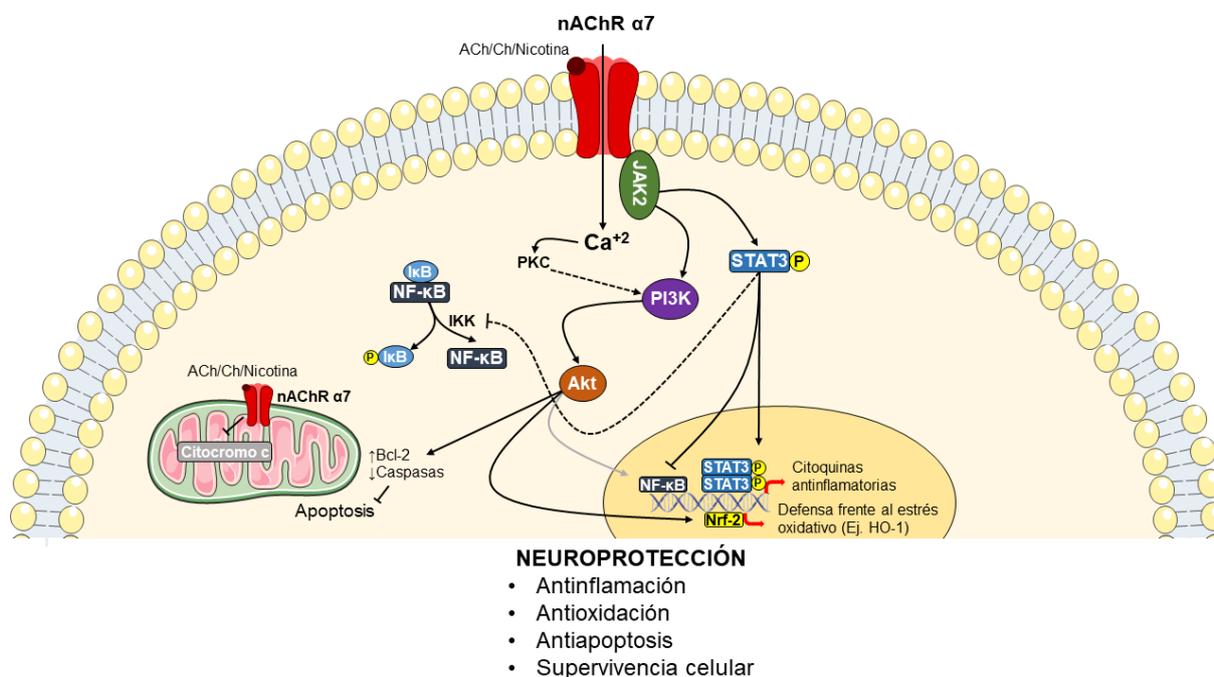


Figura 12. Rol dual ionotrópico/metabotrópico del nAChR $\alpha 7$. Se indican algunas de las vías de señalización desencadenadas subsecuentemente a la activación de $\alpha 7$, por incremento del Ca^{+2} intracelular y/o por interacción directa del receptor con proteínas como JAK2. Se muestra el efecto antiapoptótico de $\alpha 7$ mitocondrial y de la vía JAK2-PI3K-Akt, promoviendo la neuroprotección.

Por las razones antes expuestas, se ha postulado un **rol dual ionotrópico/metabotrópico del nAChR $\alpha 7$** , ya que la respuesta eléctrica transitoria generada por su actividad de canal iónico se prolonga, a través del influjo de Ca^{+2} y de su incremento intracelular o de la interacción con distintas proteínas, generando eventos o respuestas más sostenidas que involucran diversas cascadas de señalización intracelular (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Egea *et al.*, 2015; Kabbani y Nichols, 2018) (Figura 12). Por ello se considera que la rápida activación y desensibilización del receptor en su accionar ionotrópico constituyen un **mecanismo de defensa** que impediría la toxicidad y muerte celular que podrían generarse por un eventual ingreso masivo de Ca^{+2} , pero aun estando el receptor desensibilizado, su señalización y funcionalidad pueden sostenerse en el tiempo a través de su accionar metabotrópico. Incluso en células no excitables, como las células gliales y del sistema inmune, parece que la respuesta metabotrópica del receptor $\alpha 7$ predomina sobre su función ionotrópica, la cual no ha podido ser detectada hasta el momento en células no neuronales, con excepción de los macrófagos (Báez-Pagán *et al.*, 2015). Si bien es claro que las cascadas de señalización desencadenadas por la actividad ionotrópica y/o metabotrópica de $\alpha 7$ ejercen un rol clave en la inmunidad, el control de la

respuesta inflamatoria, la supervivencia celular y la neuroprotección, los mecanismos exactos que se inducen en cada tipo celular aún no han sido completamente dilucidados (Shytle *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2007; Shen y Yakel, 2012; Grando, 2014; Dineley *et al.*, 2015; Egea *et al.*, 2015).

4.2. Modulación farmacológica

El funcionamiento de los nAChRs puede ser modulado farmacológicamente por diferentes compuestos o ligandos, ya sean naturales o sintéticos. Los **ligandos ortostéricos** se unen al **sitio ortostérico** o de unión del agonista endógeno, y los **ligandos alostéricos** se unen a cualquier otro sitio de la proteína distinto del ortostérico, denominado **sitio alostérico** (Figura 13).

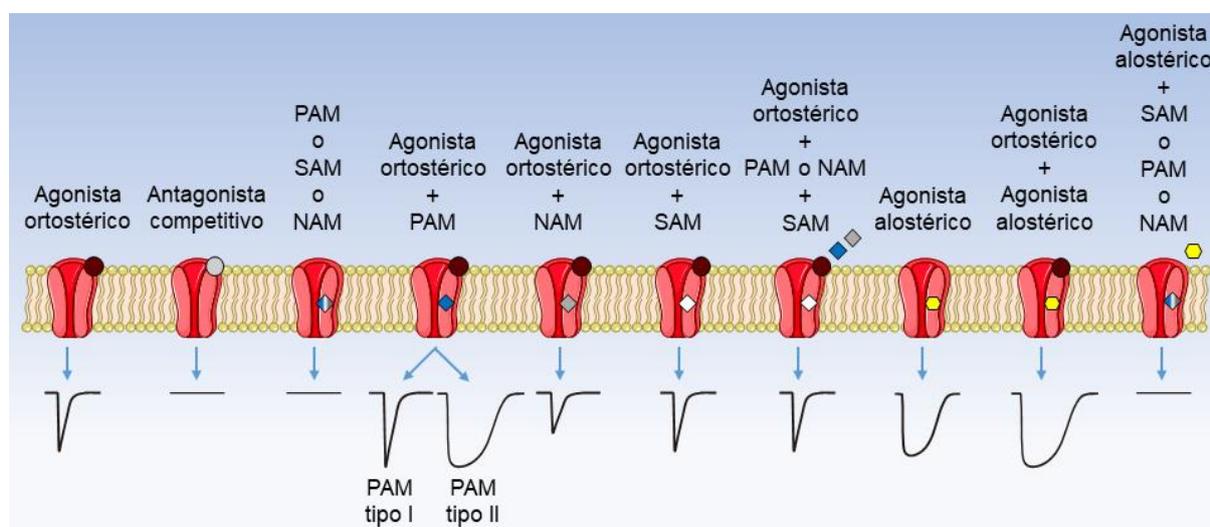


Figura 13. Esquema general de la modulación farmacológica del nAChR $\alpha 7$ por diferentes ligandos. Se muestran ligandos ortostéricos (agonista ortostérico y antagonista competitivo), alostéricos (PAMs tipo I y tipo II, NAM, SAM y agonista alostérico) y la combinación de ligandos ortostéricos y alostéricos. La localización de los sitios de unión alostéricos es ilustrativa. En la porción inferior se observa la respuesta esperada del receptor a nivel de la corriente macroscópica, la cual puede estar ausente o presente, con o sin cambios en su amplitud y cinética.

4.2.1. Ligandos ortostéricos

4.2.1.1. Agonistas ortostéricos

Un **agonista** es un ligando que se une al sitio ortostérico del receptor (presenta afinidad), y desencadena su activación (presenta eficacia) (Figura 13). Teniendo en cuenta la eficacia o actividad intrínseca de los agonistas que interaccionan con un dado receptor, se pueden diferenciar **agonistas completos**, los cuales evocan la máxima respuesta o actividad intrínseca en ese sistema, y **agonistas parciales**, los cuales exhiben menor eficacia que los agonistas completos. A nivel molecular, ambos tipos de agonistas se unen al sitio ortostérico estabilizando la misma conformación abierta del receptor, por lo tanto, evocan eventos de activación de igual conductancia unitaria. Aparentemente, las diferentes eficacias radican en que los agonistas parciales resultan menos efectivos en favorecer

los cambios conformacionales que permiten pasar del estado cerrado al estado intermedio o pre-activo (Lape *et al.*, 2008; Mukhtasimova *et al.*, 2009; Corradi y Bouzat, 2014). Si bien para definir un agonista completo o parcial en general se considera la máxima respuesta ionotrópica del receptor, se han identificado agonistas parciales ineficientes en la activación del canal iónico, pero con la capacidad de estabilizar el estado no conductor desensibilizado del receptor, desencadenando vías de señalización intracelulares por mecanismos metabotrópicos. Muchos de estos agonistas parciales tienen una eficacia cercana a cero con respecto a la respuesta ionotrópica (por lo cual se los ha denominado “**agonistas silentes**” o “desensibilizadores silentes”), pero exhiben una respuesta metabotrópica notoria en células no excitables al desplazar el equilibrio de conformaciones del receptor hacia el estado desensibilizado (Hurst *et al.*, 2013; Papke, 2014; Manetti *et al.*, 2018).

Los agonistas endógenos de cada receptor, ACh en el caso de los nAChRs, suelen ser siempre agonistas completos. Si bien el agonista endógeno activa todos los subtipos de receptores muscarínicos y nicotínicos, se han desarrollado agonistas selectivos para el receptor $\alpha 7$, como por ejemplo, el PNU-282987 (N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-clorobenzamida clorhidrato) (Bodnar *et al.*, 2005). Como se mencionó previamente, el farmacóforo del agonista de los nAChRs presenta necesariamente un nitrógeno catiónico (cuaternario) que interactúa con la cara principal del sitio ortostérico. Además, es preferente la presencia de un aceptor de puente hidrógeno que interactúe con la cara complementaria, aunque no resulta indispensable.

4.2.1.2. Antagonistas competitivos

Un **antagonista competitivo** es un ligando que se une al sitio ortostérico del receptor (presenta afinidad), sin desencadenar la activación del mismo (no presenta eficacia) (Figura 13). Se estima que las interacciones que establece el antagonista competitivo en el sitio ortostérico son diferentes a las de los agonistas, ya que, por ejemplo, tras su unión no ocurre el cierre del *loop* C de la cara principal, lo cual podría estar vinculado con su incapacidad para activar al receptor (Celie *et al.*, 2004; DaCosta y Baenziger, 2013; Hurst *et al.*, 2013). Un ejemplo de antagonista competitivo selectivo para $\alpha 7$ es la metillicaconitina (MLA), un alcaloide natural.

4.2.2. Ligandos alostéricos

Los ligandos alostéricos son moléculas que, al unirse a distintos sitios alostéricos de la proteína, modifican la energía libre asociada a las transiciones alostéricas o a los cambios conformacionales entre los estados funcionales del receptor. Es así que existen distintos perfiles farmacológicos de ligandos alostéricos (Figura 13), que pueden compartir o no los sitios alostéricos de unión. Se ha demostrado que pequeñas modificaciones en la estructura química de un ligando alostérico son suficientes para cambiar su perfil farmacológico (Chatzidaki y Millar, 2015; Gill *et al.*, 2015).

4.2.2.1. Moduladores alostéricos positivos (PAMs)

Los **moduladores alostéricos positivos (PAMs, Positive Allosteric Modulators)** son ligandos que se unen a un sitio alostérico potenciando la respuesta del receptor en presencia del agonista ortostérico. Incrementan la afinidad aparente del receptor por el agonista, la pendiente de la curva concentración-respuesta y la máxima respuesta o eficacia. Los PAMs carecen de actividad intrínseca, es decir, son incapaces de provocar la activación del receptor por sí solos, únicamente modulan positivamente los efectos evocados por el agonista ortostérico (Figura 13).

Los PAMs se han clasificado en dos tipos principales según el mecanismo molecular por el cual inducen la potenciación (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Faghieh *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2011b; Chatzidaki y Millar, 2015) (Figura 14):

- **PAMs tipo I:** disminuyen la barrera energética de la transición entre el estado cerrado y el estado activo del receptor, incrementando la probabilidad de apertura; y/o aumentan la barrera energética entre el estado abierto y el estado desensibilizado. Los cambios observados en las corrientes macroscópicas evocadas por agonistas ortostéricos en presencia de PAMs tipo I implican un incremento en el pico máximo sin modificaciones (o con cambios mínimos) en la desensibilización. El ejemplo prototipo de PAMs tipo I selectivo de $\alpha 7$ es el 5-HI (5-hidroxiindol) (Zwart *et al.*, 2002). Otros PAMs tipo I son galantamina (Samochocki *et al.*, 2003), ivermectina (IVM) (Krause *et al.*, 1998), NS-1738 (N-(5-cloro-2-hidroxifenil)-N'-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]urea) (Timmermann *et al.*, 2007) y LY-2087101 (Broad *et al.*, 2006).

- **PAMs tipo II:** provocan la desestabilización del estado conformacional desensibilizado del receptor, por lo cual disminuye la barrera energética de la transición entre el estado desensibilizado y el estado activo, aumentando de este modo la probabilidad de apertura y generando una disminución de la velocidad de desensibilización y/o un aumento en la recuperación desde el estado desensibilizado. Los cambios observados en las corrientes macroscópicas evocadas por agonistas ortostéricos en presencia de PAMs tipo II implican un incremento en el pico máximo (no siempre notorio) con una marcada reducción en la velocidad de desensibilización. En algunos casos se observa la corriente inducida por el agonista que desensibiliza en forma completa al inicio, y luego un segundo pico de corriente potenciada con los cambios cinéticos en el decaimiento. Además, frente a la desensibilización de los receptores por presencia continua de agonista ortostérico, la aplicación de PAMs tipo II permite la reactivación de los receptores desensibilizados. Un ejemplo de prototipo de PAMs tipo II selectivo de $\alpha 7$ es el PNU-120596 (N-(5-cloro-2,4-dimetoxifenil)-N'-(5-metil-3-isoxazolil)-urea) (Hurst *et al.*, 2005). Otros PAMs tipo II incluyen el TQS (4-naftalen-1-il-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolina-8-sulfónico amida) (Grønlien *et al.*, 2007) y el PAM-2 (3-furan-2-il-N-p-tolilacrilamida) (Arias *et al.*, 2011).

Esta clasificación original en sólo dos tipos de PAMs se basa en los perfiles de corrientes macroscópicas evocadas por los agonistas ortostéricos en presencia de PAMs. Sin embargo, se han descrito compuestos con propiedades intermedias entre ambas clases (Dunlop *et al.*, 2009; Malysz *et al.*, 2009; Dinklo *et al.*, 2011; Sahdeo *et al.*, 2014; Chatzidaki y Millar, 2015). También se han identificado PAMs endógenos de $\alpha 7$, incluyendo los iones Ca^{+2} (Galzi *et al.*, 1996), el péptido SLURP-1 (*Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1*) (Chimienti *et al.*, 2003) y la albúmina sérica (Conroy, 2003).

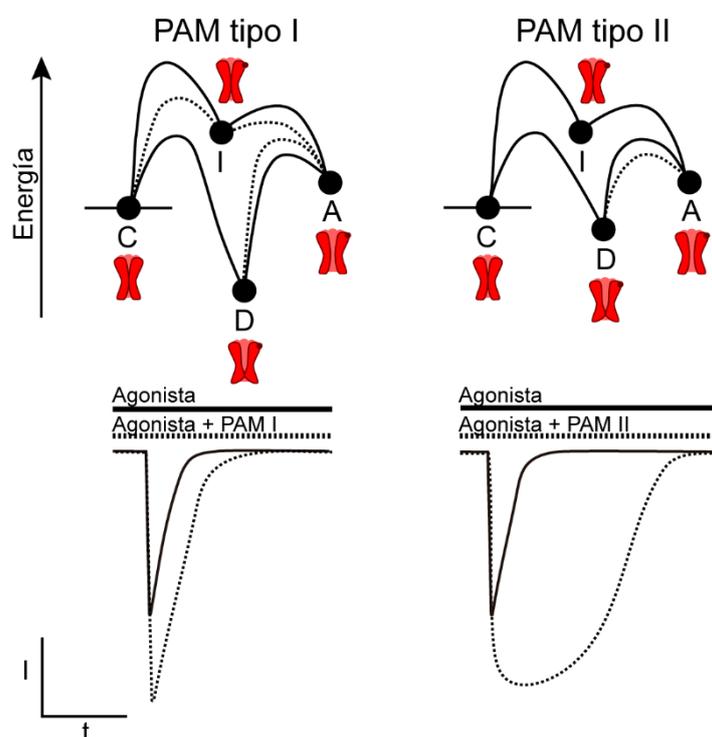


Figura 14. Posibles mecanismos de acción de los PAMs tipo I y II. En la parte superior se muestra un esquema simplificado y demostrativo de las transiciones entre los estados C (Cerrado), I (Intermedio), A (Abierto) y D (Desensibilizado) indicando las barreras energéticas asociadas a cada transición mediante líneas continuas. Las líneas punteadas indican las barreras energéticas modificadas por la presencia de PAMs tipo I o tipo II. En la parte inferior se observa un esquema de las corrientes macroscópicas en presencia sólo de agonista ortostérico (línea continua) o de agonista con PAM (línea punteada).

4.2.2.2. Moduladores alostéricos negativos (NAMs)

Los **moduladores alostéricos negativos (NAMs, Negative Allosteric Modulators)** son ligandos que se unen a un sitio alostérico disminuyendo la respuesta del receptor en presencia del agonista ortostérico. Los NAMs, al igual que los PAMs, carecen de actividad intrínseca, por lo tanto, sólo modulan los efectos evocados por el agonista ortostérico (Figura 13). La unión de los NAMs al sitio alostérico provoca un aumento en la barrera energética entre el estado conformacional cerrado y el estado activo dificultando la activación por parte del agonista ortostérico, o bien incrementa la velocidad de desensibilización. Algunos ejemplos de NAMs selectivos de $\alpha 7$ son 2,3,6MP-TQS y 2,6MP-TQS, derivados del PAM TQS con distinto número de sustituyentes metilo y fenilo (Gill *et al.*, 2015).

Los **NAMs** son considerados **antagonistas no competitivos**, aunque dentro de este grupo también se incluyen los **bloqueadores de canal abierto**. Cuando el canal se abre, estos ocluyen el poro iónico impidiendo el flujo iónico, pero no modifican el equilibrio entre los estados conformacionales del receptor.

4.2.2.3. Moduladores alostéricos silentes (SAMs)

Los **moduladores alostéricos silentes (SAMs, Silent Allosteric Modulators)** son ligandos que se unen al sitio alostérico sin producir cambios en la respuesta del receptor en presencia del agonista ortostérico. Los SAMs, al igual que los PAMs y NAMs, carecen de actividad intrínseca (Figura 13). Algunos ejemplos de SAMs selectivos de $\alpha 7$ son 2,3,5,6MP-TQS y 2,4,6MP-TQS, derivados del PAM TQS con distinto número de sustituyentes metilo y fenilo (Gill *et al.*, 2015). Los SAMs, al competir por la unión a sitios alostéricos con otros ligandos alostéricos, pueden bloquear la acción de los PAMs, NAMs y agonistas alostéricos (Figura 13).

4.2.2.4. Agonistas alostéricos o ago-PAMs

Los **agonistas alostéricos** son ligandos que al unirse al sitio alostérico provocan la activación del receptor en ausencia del agonista ortostérico. La activación alostérica del receptor se da por mecanismos moleculares diferentes a la activación ortostérica, dado que las corrientes macroscópicas presentan diferencias notables, incluyendo normalmente un incremento en el pico máximo y una marcada disminución de la velocidad de desensibilización (Figura 13). El prototipo de agonista alostérico selectivo de $\alpha 7$ es el 4BP-TQS (4-(4-bromophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolina-8-sulfonamide) (Gill *et al.*, 2011). Los agonistas alostéricos también se denominan **ago-PAMs**, dado que en presencia del agonista ortostérico actúan como PAMs generalmente tipo II (Figura 13).

4.2.2.5. Sitios alostéricos y determinantes estructurales

Una forma inequívoca para identificar los sitios alostéricos sería la co-cristalización del receptor con el ligando alostérico unido, pero en la actualidad no ha sido posible obtener siquiera la estructura cristalina del receptor $\alpha 7$. La combinación de estudios computacionales, electrofisiológicos con receptores mutantes y/o quiméricos, cristalográficos y de resonancia magnética nuclear sugieren la existencia de diversos sitios alostéricos de unión, algunos de los cuales se conservan entre los pLGICs. Podría tratarse de una vía continua de **sitios alostéricos** a lo largo del receptor, incluyendo el **ECD**, la **interfaz ECD-TMD** y el **TMD**. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que dichos estudios sólo posibilitan la identificación de “**determinantes estructurales**” del accionar de los ligandos alostéricos

y una aproximación a los sitios de unión, pero no constituyen una evidencia irrefutable acerca de su localización.

A nivel del **ECD** se han postulado al menos tres sitios alostéricos por estudios computacionales en modelos de $\alpha 7$ (Dey y Chen, 2011) y por estudios cristalográficos en una quimera de $\alpha 7$ -AChBP (Spurny *et al.*, 2015): sitio I o *top pocket* (bolsillo superior, cavidad entre la hélice α N-terminal y un *loop* inmunogénico del ECD), sitio II o *agonist subpocket* (cavidad situada por debajo del sitio ortostérico de unión al agonista) y sitio III o *vestibule pocket* (bolsillo o cavidad situada en el vestíbulo del receptor, opuesta al sitio ortostérico). Por técnicas de dinámica molecular se ha sugerido únicamente la cavidad vestibular como sitio alostérico en el ECD (Targowska-Duda *et al.*, 2018).

A nivel de la **interfaz ECD-TMD** se han identificado dos posibles sitios alostéricos por dinámica molecular para los dos tipos de PAMs (Targowska-Duda *et al.*, 2018). Además, se ha establecido la importancia de la región de acoplamiento completa para la potenciación por PAMs que se unen a nivel del TMD (Tillman *et al.*, 2014), con un rol preponderante del *loop* M2-M3 en la modulación alostérica por PAMs tipo I (Bertrand *et al.*, 2008; Grønlien *et al.*, 2010).

A nivel del **TMD** se encuentran sitios alostéricos altamente conservados entre los distintos pLGICs. Por un lado, una cavidad intrasubunidad ha sido ampliamente descrita y caracterizada como sitio de unión de los distintos PAMs tipo II, NAMs y SAMs estructuralmente relacionados y agonistas alostéricos (Young *et al.*, 2008; DaCosta *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2013, 2015; Andersen *et al.*, 2016). También se ha reportado la unión de algunos PAMs tipo I en dicha cavidad transmembrana, presuntamente en la porción superior, compartiendo algunos determinantes estructurales con los PAMs tipo II que se unirían en la porción inferior (Krause *et al.*, 1998; Collins y Millar, 2010; Collins *et al.*, 2011; Chatzidaki *et al.*, 2015). Por otro lado, una cavidad intersubunidad formada por las hélices M1-M2 de una subunidad con las hélices M3-M4 de la subunidad adyacente también ha sido identificada en el TMD. Existen datos cristalográficos donde se evidencia la unión de la IVM, un PAM tipo I, en una cavidad con similares características en el receptor de GluCl. Sin embargo, no se descarta que la IVM pueda unirse a la cavidad intrasubunidad en los nAChRs en lugar de a la intersubunidad (Lynagh y Lynch, 2012; Althoff *et al.*, 2014; Huang, Chen, *et al.*, 2017; Targowska-Duda *et al.*, 2018). Incluso algunos estudios realizados con modelos recientes del receptor $\alpha 7$ sugieren que la cavidad transmembrana originariamente catalogada como intrasubunidad es en realidad intersubunidad (Newcombe *et al.*, 2018).

Los diferentes estudios sugieren que distintos tipos de ligandos alostéricos, como por ejemplo PAMs tipo I y II, podrían unirse a los mismos sitios y/o presentar determinantes estructurales similares. La unión de los PAMs tipo II a la cavidad transmembrana está ampliamente aceptada. Incluso algunos estudios sugieren que todos los PAMs se unen al TMD con cierto grado de solapamiento en la localización de los sitios alostéricos, y que el efecto deletéreo que se observa para algunos PAMs al

afectar la integridad del ECD y/o de la interfaz ECD-TMD se debe únicamente a su influencia en el mecanismo molecular o de transducción de señal que tiene lugar durante la potenciación (Young *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2011; Chatzidaki *et al.*, 2015; Chatzidaki y Millar, 2015). Sin embargo, los determinantes estructurales del ECD tienen mayor preponderancia en la potenciación por los PAMs tipo I que por los PAMs tipo II, por lo tanto, el sitio alostérico de unión de los PAMs tipo I continúa siendo el más controversial (Chatzidaki y Millar, 2015; Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat *et al.*, 2018). También se han propuesto modelos que requieren de **dos sitios alostéricos** de unión. Estudios de dinámica molecular proponen que los PAMs tipo II se unirían a la interfaz ECD-TMD además de a la cavidad transmembrana para ejercer potenciación (Targowska-Duda *et al.*, 2018). En el caso de los agonistas alostéricos, se ha sugerido que sólo inducen activación al unirse simultáneamente a la cavidad vestibular del ECD y a la cavidad del TMD, mientras que la unión únicamente al TMD en presencia de un agonista ortostérico, derivaría en su comportamiento como PAMs tipo II (Horenstein *et al.*, 2016).

4.3. Relevancia clínica: activación y modulación del receptor nicotínico $\alpha 7$ como estrategia terapéutica

Como se mencionó previamente, el receptor nicotínico $\alpha 7$ media el rol neuromodulador de la ACh en los circuitos neuronales que controlan los procesos de cognición, memoria, aprendizaje, procesamiento de la información sensorial, atención y recompensa; y además ejerce un efecto neuroprotector a través de acciones antioxidantes y antiinflamatorias. Por lo tanto, es esperable que la disfunción de la señalización colinérgica mediada por $\alpha 7$ se encuentre asociada a numerosos desórdenes neurológicos, psiquiátricos, inflamatorios y neurodegenerativos, no sólo a nivel del SNC, sino también a nivel periférico, dada la ubicua localización de este receptor (Dineley *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Bouzat *et al.*, 2018). Esto convierte al **receptor $\alpha 7$** en un **blanco farmacológico o terapéutico** de gran interés para enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, trastorno de déficit de atención e hiperactividad, enfermedad de Parkinson, adicciones, dolor, etc. Como en general estos desórdenes se asocian a una disminución en los niveles de ACh, en la expresión y/o en la actividad del receptor, los enfoques terapéuticos pretenden incrementar la funcionalidad de $\alpha 7$ mediante agonistas y/o PAMs selectivos (Figura 15).

Inicialmente el desarrollo farmacológico se ha centrado en los **agonistas selectivos de $\alpha 7$** , particularmente en los **agonistas parciales**. A diferencia de los agonistas completos, estos ligandos ortostéricos inducen activación con menor eficacia, y al combinarse con los bajos niveles del agonista endógeno, se promueve un efecto sinérgico de ambos, incrementando la señalización colinérgica. La menor respuesta máxima otorga un mayor margen de seguridad en el uso terapéutico y disminuye los efectos adversos por sobreestimulación del receptor. Sin embargo, como desventaja, los tratamientos

prolongados con agonistas exógenos alteran los patrones de secreción del agonista endógeno e inducen la desensibilización e internalización de los receptores de membrana, generando tolerancia y/o dependencia. Además, dado el alto grado de conservación del sitio ortostérico dentro de los nAChRs, la selectividad de los agonistas es más limitada, y su unión a otros subtipos de receptores puede conllevar efectos adversos, por lo que se requiere del diseño de drogas capaces de activar a través de interfaces específicas de un dado receptor (Papke, 2014; Foucault-Fruchard y Antier, 2017; Yang *et al.*, 2017; Manetti *et al.*, 2018).

Por otro lado, el interés se ha expandido hacia los ligandos alostéricos en sus diversas formas, dado que los sitios alostéricos de unión resultan menos conservados que el sitio ortostérico entre los nAChRs y pLGICs, permitiendo el desarrollo de drogas más selectivas (Corradi y Bouzat, 2016; Yang *et al.*, 2017; Bouzat *et al.*, 2018; Manetti *et al.*, 2018). Particularmente los **PAMs** resultan prometedores a nivel terapéutico por varias ventajas:

- Mantenimiento del patrón temporal y espacial del agonista endógeno: como carecen de actividad intrínseca, requieren la presencia de ACh para modular positivamente la actividad del receptor.
- Mayor selectividad con efectos subtipo-específicos.
- Menor proporción de efectos adversos o no deseados: son más selectivos y no inducen tolerancia/dependencia al no ser agonistas.
- Mayor diversidad a nivel estructural y en magnitud de efecto potenciador y neuroprotector: mínimos cambios en la estructura química generan variable actividad.

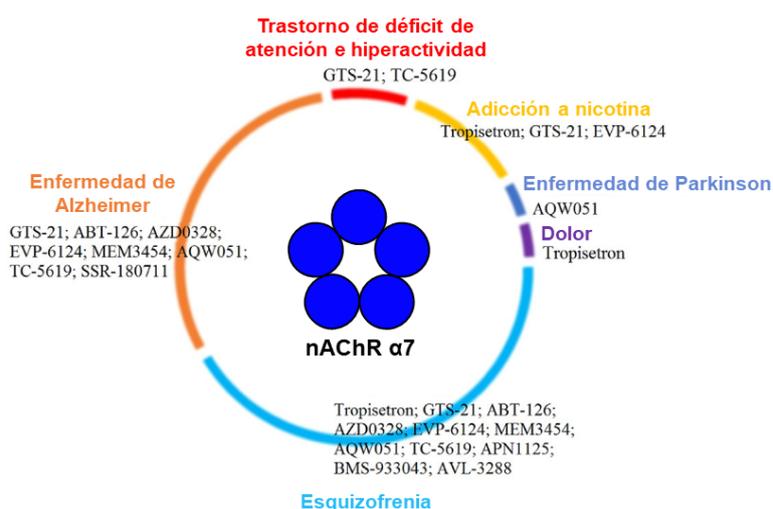


Figura 15. Agonistas y PAMs de $\alpha 7$ en evaluación actual en ensayos clínicos (datos hasta 2019 inclusive). Del total de once drogas candidatas, TC-5619 es un agonista completo, AVL-3288 es un PAM tipo I y las restantes nueve son agonistas parciales (Modificado de (Yang *et al.*, 2017)).

Numerosos estudios en modelos animales se están llevando a cabo con diferentes PAMs, mostrando efectos pro-cognitivos, antiinflamatorios y antidepresivos prometedores (Figura 15) (Yang *et al.*, 2017; Manetti *et al.*, 2018). En ensayos clínicos en humanos se han evaluado hasta el momento dos PAMs tipo I para esquizofrenia, JNJ39393406 y AVL-3288, habiéndose obtenido resultados positivos para este último (Winterer *et al.*, 2013; Gee *et al.*, 2017).

Cabe destacar que el uso de agonistas y/o PAMs de $\alpha 7$ no sólo incrementaría su actividad ionotrópica, sino también su rol metabotrópico con efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antiapoptóticos. Esto resulta favorable en desórdenes donde la inflamación influye en la patogénesis, como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el incremento de la actividad de $\alpha 7$ no resulta beneficioso a nivel periférico en ciertas células no neuronales, ya que promueve el desarrollo de cáncer por estimulación de la proliferación y supervivencia celular, la metástasis y la angiogénesis. Aún en estos casos, $\alpha 7$ constituye un blanco farmacológico de interés, pero con el objetivo de promover la disminución de la actividad del receptor mediante el desarrollo de antagonistas competitivos y NAMs (Schuller, 2009; Grando, 2014; Zhao, 2016).

En síntesis, la **señalización colinérgica ionotrópica en el SNC** es mediada por distintos **nAChRs**, y dentro de este grupo, los receptores que contienen **subunidades $\alpha 7$** exhiben un **rol dual ionotrópico/metabotrópico** particular y diferencial a través del cual modulan diversos circuitos neuronales implicados en **procesos fisiológicos** y en condiciones patológicas asociadas, por lo cual constituyen un promisorio **blanco terapéutico**. Hasta la actualidad, la mayoría de los estudios se han enfocado en los receptores homoméricos $\alpha 7$, ya que se desconocía la capacidad de dicha subunidad para coensamblarse con otras subunidades dando lugar a receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$, con estequiometrías y roles fisiológicos/fisiopatológicos aún desconocidos.

El presente trabajo de tesis aborda el estudio de la **función molecular de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos**, con el objetivo de descifrar las bases moleculares de su **activación y modulación alostérica** por diversos fármacos, muchos de los cuales exhiben un promisorio potencial terapéutico para desórdenes neurológicos, neurodegenerativos e inflamatorios, y así dilucidar el **impacto diferencial** de las distintas estequiometrías o subtipos de receptores $\alpha 7$ en la señalización colinérgica del SNC.

METODOLOGÍA



METODOLOGÍA

1. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTOR NICOTÍNICO SALVAJES, MUTANTES Y QUIMÉRICAS

Para los experimentos desarrollados en la presente tesis se utilizaron los ADN complementarios (ADNc) de las subunidades humanas de nAChRs $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ salvajes (WT, *Wild-Type*), los ADNc de las chaperonas humanas del receptor $\alpha 7$ Ric-3 (*Resistant to Inhibitors of Cholinesterase 3*) y NACHO (o TMEM35, *Transmembrane Protein 35*), y el ADNc de la proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescence Protein*). Los diferentes ADNc fueron subclonados en los vectores plasmídicos pRBG4 o pcDNA3.1 Hygro (-) (Invitrogen, Reino Unido). Las secuencias nucleotídicas fueron posteriormente verificadas por técnicas de secuenciación.

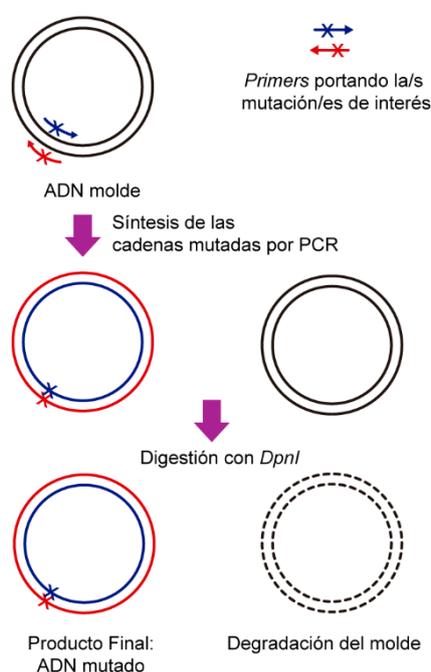


Figura 1. Esquema del protocolo de mutagénesis dirigida. La secuencia de pasos mostrada permite la obtención del ADN portando las mutaciones puntuales de interés.

A partir de dichos ADNc WT se generaron subunidades mutantes portando una a cinco mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Para ello se diseñaron oligonucleótidos denominados cebadores o *primers*, con secuencias idénticas a las del ADNc WT excepto por las bases nucleotídicas que codificaban los aminoácidos a mutar. Dichos *primers* fueron utilizados con el kit de mutagénesis dirigida *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis* (Agilent, Reino Unido) para generar las mutaciones en la secuencia nucleotídica de las subunidades salvajes subclonadas en vectores, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) con la enzima polimerasa *Pfu Ultra* de alta fidelidad (Figura 1). Posteriormente, al producto de PCR que contenía un elevado número de copias del vector con la

subunidad mutante se le realizó una digestión con la enzima *DpnI* (Figura 1). Esta degrada únicamente el ADN del templado salvaje porque reconoce metilaciones en su secuencia, las cuales provienen de la amplificación bacteriana previa. Las secuencias finales portando las mutaciones de interés fueron confirmadas por secuenciación nucleotídica.

También se utilizaron subunidades quiméricas $\alpha 7$ -5HT₃A HC o de alta conductancia (Eiselé *et al.*, 1993; Bouzat *et al.*, 2004), conformadas por el segmento extracelular desde el extremo N-terminal hasta la porción pre-M1 de la subunidad $\alpha 7$ humana, y por el resto de la secuencia de la subunidad del receptor de serotonina tipo 3A (5-HT₃A) de ratón. Además, la subunidad quimérica posee tres mutaciones puntuales en el ICD (R432Q, R436D y R440A) que le otorgan alta conductancia (Introducción, pág. 17).

2. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE SUBUNIDADES DE RECEPTOR NICOTÍNICO CONCATENADAS

Los concatámeros consisten en constructos de ADN que contienen copias múltiples de una misma secuencia de nucleótidos dispuestas una tras otra, es decir, en serie o en tándem. Todas las regiones codificantes quedan localizadas en el mismo casete de expresión bajo idéntico marco de lectura. En la presente tesis se diseñaron y construyeron concatámeros de nAChRs en sucesivos pasos, concatenando las secuencias nucleotídicas de dos a cinco subunidades del receptor en diferentes arreglos lineales ($\alpha 7$, $\beta 2$ y/o $\beta 4$), y separándolas entre sí por segmentos que codifican repeticiones de alanina-glicina-serina (AGS), las cuales constituyen los *linkers* peptídicos. Como resultado se expresa un receptor concatamérico con cinco subunidades proteicas covalentemente unidas desde el extremo C-terminal de una subunidad hasta el extremo N-terminal de la subunidad adyacente mediante *linkers* peptídicos, permitiendo el control del arreglo espacial de las subunidades y de las estequiometrías de los receptores.

2.1. Optimización de la composición y longitud de los *linkers* peptídicos

La composición y longitud de los *linkers* peptídicos resultan fundamentales para garantizar una expresión eficiente de los receptores concataméricos, impidiendo o disminuyendo la probabilidad de que ocurra proteólisis, plegamiento anormal de las subunidades proteicas, interacciones tridimensionales no deseadas entre receptores concataméricos y/o ensamblaje incorrecto por orientación espacial no controlada. Los *linkers* peptídicos se extienden desde el extremo C-terminal flexible de una subunidad hacia el extremo N-terminal de la subunidad adyacente, pudiendo exhibir una orientación espacial en sentido horario o antihorario (Figura 2A-C). Como el extremo N-terminal de la subunidad consiste en una estructura de hélice α en sentido horario, la orientación espacial antihoraria del *linker* resulta ser la que requiere menor longitud para enlazar las subunidades adyacentes y la energéticamente más favorable (Ericksen y Boileau, 2007) (Figura 2C).

En el presente trabajo de tesis, los *linkers* peptídicos fueron diseñados optimizándolos a la menor longitud posible que garantizara el ensamblaje de las subunidades mayoritariamente en sentido antihorario, y habilitara la formación de un receptor concatamérico funcional. De este modo se limitó el ensamblaje no deseado de las subunidades en orientación horaria, evitando conclusiones erróneas derivadas de la coexistencia de receptores concataméricos con diferente arreglo espacial. La longitud total de los *linkers* se definió incluyendo la secuencia C-terminal flexible de la subunidad del receptor, un primer segmento de repeticiones AGS, la porción correspondiente al sitio de restricción de la secuencia nucleotídica y un segundo segmento de repeticiones AGS hasta alcanzar la subunidad adyacente en su extremo N-terminal, el cual no forma parte del *linker* (Figura 2D). La longitud de los *linkers* fue de hasta 45 aminoácidos con un total de entre 5 y 10 repeticiones AGS para compensar las diferencias en la longitud de los extremos C-terminal de las diferentes subunidades a concatenar.

La composición de los *linkers* con repeticiones del tripéptido AGS fue elegida por su mínimo impacto en la estructura tridimensional y en el plegamiento de las subunidades, y por la escasa a nula probabilidad de experimentar proteólisis por proteasas intracelulares (Ericksen y Boileau, 2007; Ahring *et al.*, 2018). Como igualmente la proteólisis no puede descartarse en su totalidad, durante el desarrollo de los experimentos se realizaron distintos controles empleando mutaciones reporteras dentro del concatámero o en subunidades aisladas coexpresadas con el receptor concatamérico.

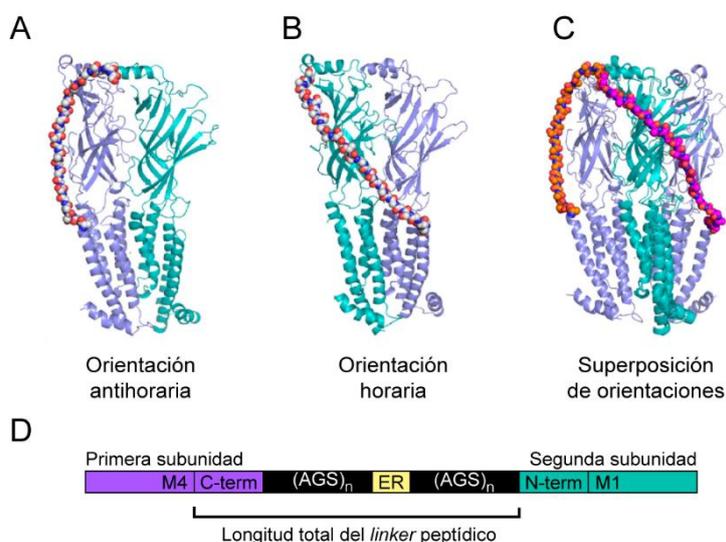


Figura 2. Composición y orientación espacial de los *linkers* peptídicos. A-C- Se muestra un modelo tridimensional de dímeros de $\alpha 4\beta 2$ (PDB: 5KXI, (Morales-Perez *et al.*, 2016)). El *linker* peptídico se extiende desde el extremo C-terminal de una subunidad (violeta) hacia el extremo N-terminal de la subunidad adyacente (verde), y puede adoptar dos orientaciones espaciales: sentido antihorario (A) u horario (B). Minimizando la longitud del *linker* se garantiza el predominio del ensamblaje en sentido antihorario, puesto que la otra disposición requiere de longitudes de *linker* mayores (C) (Modificado de (Ahring *et al.*, 2018)). D- La longitud total del *linker* fue definida incluyendo el extremo C-terminal de la primera subunidad, las repeticiones AGS y la porción codificada por el sitio de enzimas de restricción (ER).

2.2. Construcción de concatámeros

La construcción de los concatámeros se inició preparando las subunidades individuales para el proceso de concatenación mediante dos pasos consecutivos de PCR de extensión por solapamiento (OE-PCR, *Overlap Extension PCR*) (Figura 3). Esta variante de la técnica de PCR convencional implica el uso de *primers* cuya secuencia es parcialmente complementaria a la secuencia original del molde o templado a nivel del extremo 3', mientras que el extremo 5' del cebador contiene la porción nueva de secuencia no complementaria que se desea incorporar al molde de ADN. De este modo, el *primer* sólo hibrida con el templado por solapamiento mediante el extremo 3', a partir del cual la enzima ADN polimerasa prosigue la síntesis y extensión de la cadena en sentido 5'→3', quedando incorporada en el producto final de amplificación la secuencia nucleotídica nueva añadida en el extremo 5' (Figura 3).

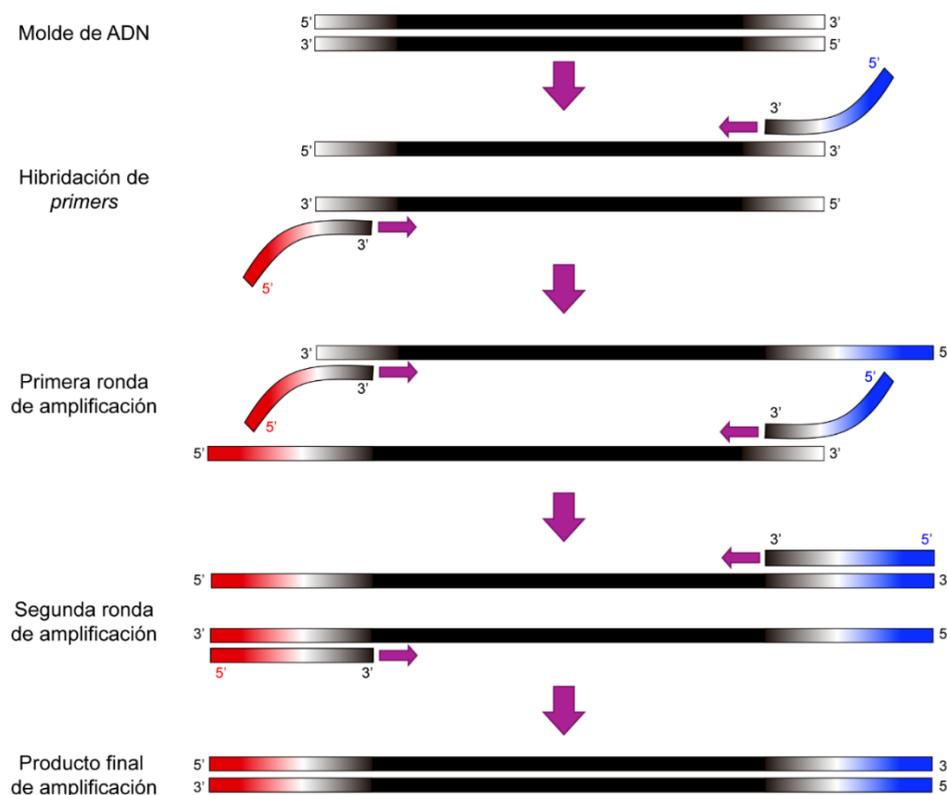


Figura 3. Esquema de la reacción de PCR de extensión por solapamiento (OE-PCR). Las secuencias de los *primers* utilizados son complementarias al ADN molde en el extremo 3' (negro) y añaden una secuencia nueva de interés en el extremo 5' (rojo y azul). Mientras el extremo 3' hibrida o “solapa” en forma específica, el extremo 5' permanece libre, y tras la primera ronda de amplificación, las cadenas molde incorporan la nueva porción de secuencia en su extremo 5'. Durante la segunda ronda de amplificación y sucesivas, los *primers* pueden hibridar completamente, permitiendo la obtención de un producto final que consiste en el ADN molde con secuencias añadidas en ambos extremos de la doble hélice.

En el primer paso de PCR, a la primera subunidad se le insertó la secuencia Kozak (GCCACC) justo antes de la secuencia del péptido señal para facilitar el inicio de la traducción, y a todas las subunidades se les eliminaron los codones de finalización y se añadieron la mitad de los nucleótidos correspondientes a su porción de secuencia del *linker* peptídico, río arriba y río abajo de los extremos

5' y 3' de la región codificante. En el segundo paso de PCR, a todas las subunidades se les incorporaron los nucleótidos restantes de su porción de secuencia del *linker* peptídico, y a continuación se introdujeron los sitios de restricción únicos para el posterior subclonado sucesivo en el vector plasmídico. A la última subunidad se le añadió también el codón de finalización.

Cada subunidad individual preparada para la concatenación fue subclonada en un vector pcDNA3.1 Hygro (-) (Invitrogen, Reino Unido), cuyo sitio de clonado múltiple fue modificado por hibridación con oligonucleótidos para añadir los sitios de restricción específicos que facilitarían el ensamblaje de las subunidades a concatenar (Carbone *et al.*, 2009). Por secuenciación completa del ADNc de cada subunidad aislada preparada para la concatenación se verificó la ausencia de mutaciones no deseadas tras los dos pasos de OE-PCR. Luego se obtuvieron los constructos pentaméricos por el subsecuente ensamblaje de subunidades mediante reacciones de ligación estándar con la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs, EE.UU.). En todos los concatámeros finales cada subunidad quedó delimitada por los siguientes sitios de restricción: *AscI/XbaI* para la primera subunidad, *XbaI/AgeI* para la segunda subunidad, *AgeI/XhoI* para la tercera subunidad, *XhoI/NotI* para la cuarta subunidad y *NotI/EcoRV* para la quinta subunidad (Figura 4). Tras el ensamblado, el concatámero completo fue subclonado en el vector pCI (Promega, Reino Unido) para favorecer la expresión en células de mamífero. La presencia de las cinco subunidades en el constructo fue verificada por digestión con enzimas de restricción y separación e identificación de los fragmentos de tamaño específico por electroforesis en gel de agarosa (0,8 %).

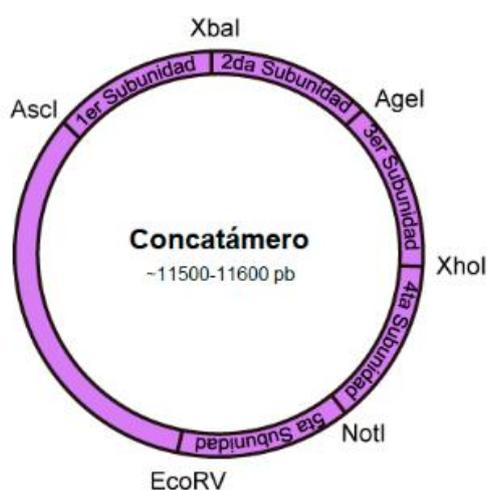


Figura 4. Esquema del concatámero subclonado en el vector plasmídico. Se muestran los sitios de enzimas de restricción que flanquean cada subunidad.

Los concatámeros portando mutaciones fueron obtenidos tras introducir las mutaciones puntuales de forma aislada en la subunidad de interés preparada para concatenación. Luego la subunidad mutante fue ligada al concatámero haciendo uso de los sitios de restricción únicos que

flanquean cada subunidad. Finalmente, la incorporación de la mutación en el concatámero se verificó al cortar dicha subunidad del mismo y secuenciarla por completo.

2.3. Estequiometrías de los receptores concataméricos $\alpha 7$ heteroméricos

Se construyeron un receptor concatamérico $\alpha 7$ homomérico representado como $(\alpha 7)_5$, y una serie de receptores concataméricos $\alpha 7$ heteroméricos combinando subunidades $\alpha 7$ con subunidades $\beta 2$ o $\beta 4$. Del subtipo $\alpha 7\beta 2$ se generaron concatámeros conteniendo una, dos y tres subunidades $\beta 2$, los cuales fueron denotados como $(\alpha 7)_4\beta 2$, $(\alpha 7)_3(\beta 2)_2$ y $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ respectivamente. Del subtipo $\alpha 7\beta 4$ se diseñaron las estequiometrías análogas, representadas como $(\alpha 7)_4\beta 4$, $(\alpha 7)_3(\beta 4)_2$ y $(\alpha 7)_2(\beta 4)_3$.

3. DROGAS PARA LA ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS

Los agonistas ortostéricos de nAChRs utilizados fueron la ACh (Sigma-Aldrich, EE.UU.), como agonista endógeno no selectivo, y el PNU-282987 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), como agonista específico del receptor $\alpha 7$. Como agonista alostérico selectivo de $\alpha 7$ se utilizó el 4BP-TQS (Tocris Biosciences, Reino Unido). Como antagonista específico de $\alpha 7$ se empleó la α -Bgt (ThermoFisher Scientific, EE.UU.). Los PAMs utilizados fueron el 5-HI (Sigma-Aldrich, EE.UU.), el NS-1738 (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y el PNU-120596 (Tocris Biosciences, Reino Unido).

Además, se evaluó el efecto de distintos compuestos químicos naturales y sintéticos sobre los nAChRs. Por un lado, como compuestos de origen natural se utilizaron tres flavonoides: genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.), quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxichromen-4-ona, Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) y el neoflavonoide 5,7-dihidroxi-4-fenilcumarina (Sigma Aldrich, EE.UU.). Por otro lado, como compuestos sintéticos se evaluaron derivados de 1,2,3-triazol funcionalizados con grupos fosfonato, sintetizados en el Laboratorio de Catálisis y Síntesis de Compuestos Bioactivos del INQUISUR (Instituto de Química del Sur).

Las soluciones stock de la ACh y el 5-HI fueron preparadas en agua o *buffers*. Para el resto de los compuestos evaluados, la solución stock fue preparada en dimetilsulfóxido (DMSO).

4. ENSAYOS EXPERIMENTALES EN OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Todos los ensayos en ovocitos de *Xenopus laevis* fueron llevados a cabo en el laboratorio de Farmacología Molecular de la Universidad de Oxford Brookes, Oxford, Reino Unido.

4.1. Animales

Los ejemplares hembra adultos de la rana africana *Xenopus laevis* fueron adquiridos de Nasco (WI, EE.UU.), hospedados en tanques color negro con al menos 15 litros de agua por animal a temperatura controlada de 18 °C, mantenidos bajo ciclos fijos de 12 horas de luz/oscuridad y

alimentados dos veces al día. El agua fue renovada semanalmente. El cuidado y procedimientos experimentales de los ejemplares de *Xenopus* fueron acordes a las regulaciones pertinentes en Reino Unido (*UK Home Office*) y aprobados por el Comité de Uso Animal de la Universidad de Oxford Brookes.

4.2. Obtención, aislamiento y selección de ovocitos

Las ranas fueron anestesiadas y sacrificadas por personal capacitado. Mediante la realización de una incisión visceral, se procedió a la remoción de los ovarios (Figura 5) y su rápida colocación en solución estándar de ovocitos (SOS, *Standard Oocyte Solution*) estéril libre de Ca^{+2} (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, MgCl_2 2,8 mM, HEPES 5 mM, pH = 7,4 ajustado con NaOH). Los lóbulos de tejido ovárico fueron disociados en dos etapas: inicialmente de forma mecánica, en grupos de dos a tres ovocitos utilizando pinzas metálicas estériles bajo flujo laminar, y luego de forma química, por incubación con la enzima colagenasa tipo IA de *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich, EE.UU.) en agitación, para la remoción de la teca y la capa epitelial (0,5 mg/mL). Tras un período de 1-3 horas, los ovocitos fueron lavados con SOS libre de Ca^{+2} y se dejaron en agitación por otros 15-30 minutos adicionales. Si en algunos aún persistían remanentes de la membrana folicular, los mismos fueron cuidadosamente removidos con finas pinzas metálicas. Finalmente, los ovocitos fueron transferidos a cápsulas de Petri estériles con solución de Barth (NaCl 80 mM, KCl 1 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,33 mM, CaCl_2 0,41 mM, MgSO_4 0,82 mM, NaHCO_3 2,4 mM y HEPES 10 mM, pH = 7,4 ajustado con NaOH) suplementada con estreptomicina (0,1 mg/mL), penicilina (1000 U/mL) y amikacina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubados a 18 °C.



Figura 5. Esquema del proceso de obtención, aislamiento y selección de ovocitos de *Xenopus laevis*. Se muestran los distintos estadios que exhiben los ovocitos aislados del ovario.

La ovogénesis en el ovario de *Xenopus* es asincrónica (Figura 5), por lo tanto, se encuentran presentes todos los estadios de desarrollo del ovocito en el interior del órgano. Según la clasificación

de Dumont (1972), se pueden diferenciar seis estadios: I y II son previtelogénicos y transparentes, en el estadio III inicia la vitelogénesis, adquiriendo pigmentación, y progresivamente incrementan en tamaño hasta alcanzar 1000-1300 μm en los estadios V y VI, los cuales fueron seleccionados para llevar a cabo los estudios electrofisiológicos. En ambos estadios existe una neta diferenciación del polo animal (marrón oscuro) y vegetal o vegetativo (blanquecino). Además, en el estadio VI aparece una banda ecuatorial clara separando ambos polos. Los ovocitos de estadios V y VI seleccionados fueron transferidos a cápsulas de Petri e incubados a 18 $^{\circ}\text{C}$ en solución de Barth estéril con antibióticos, la cual fue renovada diariamente.

4.3. Expresión heteróloga de receptores

Los ovocitos de *Xenopus laevis* fueron empleados como sistema de expresión heterólogo para los nAChRs porque permiten una buena tasa de expresión del receptor de interés y presentan una baja proporción de canales y receptores endógenos en membrana. El ADNc o el ARNc (ARN complementario) correspondiente a las subunidades no enlazadas o a los concatámeros fue introducido en el ovocito mediante inyección (Figura 6).

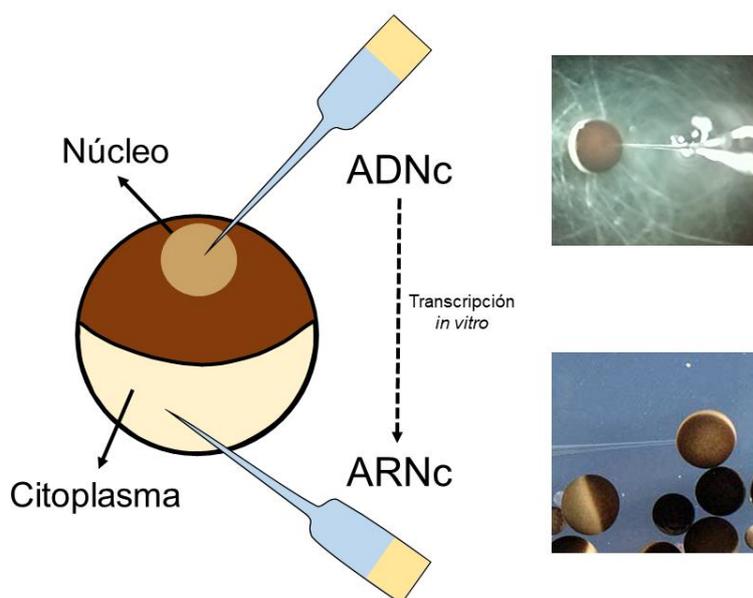


Figura 6. Tipos de inyección utilizados para la expresión de receptores en ovocitos de *Xenopus laevis*. Se muestran la inyección nuclear del ADNc y la inyección citoplasmática del ARNc, obtenido por transcripción *in vitro* del ADNc.

La presencia del promotor de citomegalovirus (CMV) en los vectores plasmídicos que contienen las subunidades permite la inyección directa del ADNc en el núcleo, donde inicialmente se transcribe a ARN, y tras movilizarse al citoplasma, es finalmente traducido a proteína. Los ovocitos fueron inyectados en el núcleo (bajo el extremo central superior del polo animal) con 2-20 ng del ADNc plasmídico en un volumen de 23 nL utilizando un inyector automático para ovocitos Nanoject

(Drummond, Broomall, EE.UU.). En algunos experimentos se coinyectó el ADNc de la subunidad $\alpha 7$ con 1-2 ng de ADNc de la chaperona NACHO para acelerar su expresión.

En el caso de los receptores concataméricos, donde la tasa de expresión es baja, se optó preferentemente por la inyección del ARNc en lugar del ADNc, ya que tras ingresar al citoplasma se traduce directamente a proteína. El ADNc plasmídico fue linealizado y posteriormente transcrito *in vitro* al ARNc con caperuza mediante el kit mMMESSAGE mMACHINE (Invitrogen, Reino Unido). Los ovocitos fueron inyectados en el citoplasma (polo vegetativo o fuera del núcleo en el polo animal) con 100 ng del ARNc en un volumen de 40-50 nL utilizando el inyector automático Nanoject. Todos los ovocitos inyectados fueron incubados a 18 °C en solución de Barth con antibióticos hasta su utilización en ensayos electrofisiológicos uno a dos días después de la inyección, tras alcanzar el máximo nivel de expresión de los receptores en la membrana plasmática.

4.4. Electrofisiología: *voltage-clamp* de dos electrodos (TEVC)

La técnica de *voltage-clamp* es uno de los métodos electrofisiológicos por excelencia para la investigación de las propiedades de los canales iónicos, puesto que permite la medición de la corriente a través de la membrana celular (I_m), manteniendo constante el potencial de membrana (V_m). Este procedimiento fue inicialmente diseñado por Cole y Marmont y mejorado por Hodgkin, Huxley y Katz para su aplicación en axones de calamar (Guan *et al.*, 2013). En un sistema de *voltage-clamp* ideal se necesitan únicamente una fuente que aporte el voltaje de interés o comando (V_c), la célula y un amperímetro para medir la I_m , y puesto que las resistencias intrínsecas de las conexiones del circuito se consideran despreciables, el V_m resulta idéntico al V_c . Sin embargo, en un sistema de *voltage-clamp* real no pueden considerarse despreciables las resistencias de las conexiones dentro del circuito, principalmente la resistencia del electrodo (R_e) que al estar dispuesta en serie con la resistencia de membrana (R_m) actúa como un divisor del voltaje, provocando una caída del V_m con respecto al V_c que no puede ser compensada. Por eso, para células de gran tamaño como los ovocitos de *Xenopus laevis*, donde $R_m \sim R_e$, se necesita un electrodo adicional para monitorear el V_m real, surgiendo así la técnica de *voltage-clamp* de dos electrodos o TEVC (*Two-Electrode Voltage Clamp*).

El método TEVC consiste en el uso de dos microelectrodos intracelulares, el electrodo 1 para monitorear el V_m y el electrodo 2 para inyectar la corriente necesaria que ajuste el valor del V_m al del V_c (Figura 7). El electrodo 1 está conectado a un amplificador de voltaje, cuya salida ingresa a un amplificador diferencial de alta ganancia que compara el V_m con el V_c de forma continua (amplificador de *voltage-clamp*). La salida de este amplificador es una corriente proporcional a la diferencia entre V_c y V_m , la cual es inyectada en la célula a través del electrodo 2, constituyendo un sistema de retroalimentación negativa que permite mantener el V_m constante. A menudo se utilizan dos electrodos de referencia sumergidos en el baño o solución salina, un electrodo que funciona como

referencia para el electrodo de medición de V_m (puesta a tierra virtual) y otro electrodo para el paso de la corriente, conectado a tierra. La corriente inyectada por el electrodo 2 resulta ser de igual magnitud a la corriente que pasa a través de la membrana plasmática, por lo tanto, puede ser medida y analizada. En el presente trabajo de tesis se empleó la técnica de TEVC, de forma manual y automática, para la medición de las corrientes de membrana generadas por los receptores nicotínicos concataméricos y no concatenados expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.

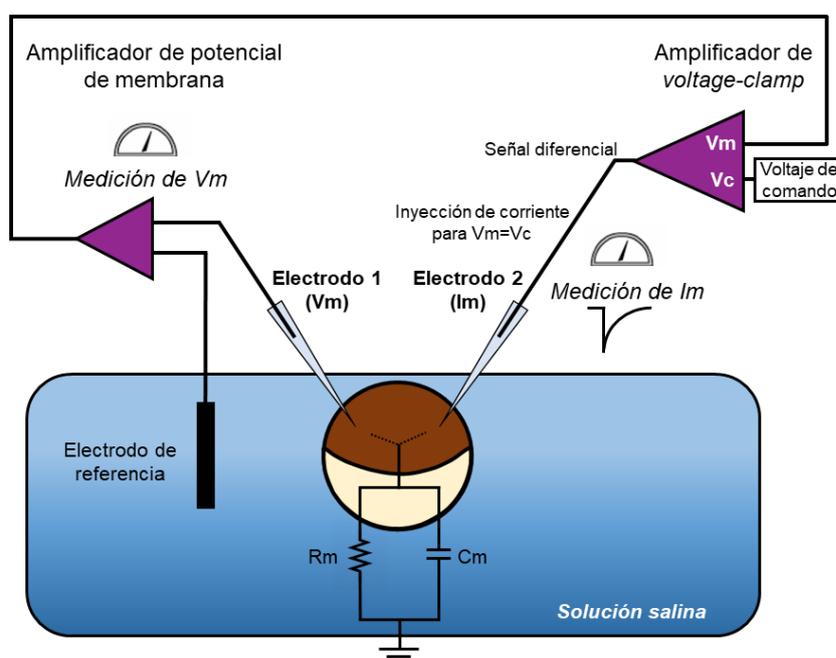


Figura 7. Técnica de *voltage-clamp* de dos electrodos (TEVC) en ovocitos de *Xenopus laevis*. El electrodo 1 monitorea el potencial de membrana V_m . A través del electrodo 2, se inyecta en el ovocito la corriente necesaria para compensar la diferencia entre V_m y V_c , permitiendo la medición de la corriente a través de la membrana a un voltaje constante (modificado de (Guan *et al.*, 2013)).

4.4.1. Soluciones

Las diferentes drogas y/o agonistas fueron disueltas en *buffer* SOS (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, CaCl_2 1,8 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 5 mM, pH = 7,4 ajustado con NaOH) a partir de las soluciones stock correspondientes en agua o DMSO. La concentración final de DMSO en todos los casos fue inferior a 0,8 % (v/v).

En los ensayos donde se estudió el efecto combinado de dos drogas se emplearon dos tipos de protocolos: *coaplicación*, donde el agonista se aplicó simultáneamente con la otra droga de interés, y *preincubación más coaplicación*, donde inicialmente el ovocito fue preincubado sólo con la droga de interés por un dado período de tiempo, para luego ser sometido a un pulso de solución conteniendo el agonista y la droga a la vez. En todos los casos se registraron corrientes de control evocadas únicamente por el agonista de forma intercalada entre cada corriente experimental.

4.4.2. Microelectrodos

Los microelectrodos de vidrio fueron realizados a partir de capilares de borosilicato con un *puller* Narishige modelo PC-10 y rellenos con solución KCl 3 M. La resistencia de los electrodos osciló entre 0,2 y 5,0 M Ω . Los mismos fueron colocados en el equipo de TEVC mediante soportes denominados *holders*, quedando en su interior el electrodo de alambre de plata previamente clorurado, contactando la solución de KCl.

4.4.3. TEVC manual

El equipo utilizado fue el amplificador Oocyte Clamp OC-725C (Warner Instruments, EE.UU.) y las corrientes fueron adquiridas con el software Labscribe (Iworx, EE.UU.) Todo el equipamiento se ubicó sobre una mesa antivibratoria, rodeado por una caja de Faraday (Figura 8). Mediante observación con una lupa binocular, cada ovocito fue colocado en el centro de una cámara de perfusión a la cual por un extremo ingresa el líquido y por el otro extremo es eliminado hacia el descarte con una bomba de vacío. Los microelectrodos se movilizaron empleando micromanipuladores hasta ingresar en contacto con el líquido y una vez allí, su voltaje fue llevado a 0 mV. Luego los microelectrodos fueron insertados en el ovocito atravesando su membrana, permitiendo medir el V_m de reposo antes de fijarlo en -60 mV para operar en modo *voltage-clamp*. Todos los ensayos electrofisiológicos con TEVC manual fueron realizados a temperatura ambiente y con un tiempo de lavado de 5 minutos con *buffer* SOS entre las aplicaciones del agonista y/o la droga, para garantizar la reproducibilidad entre los registros.

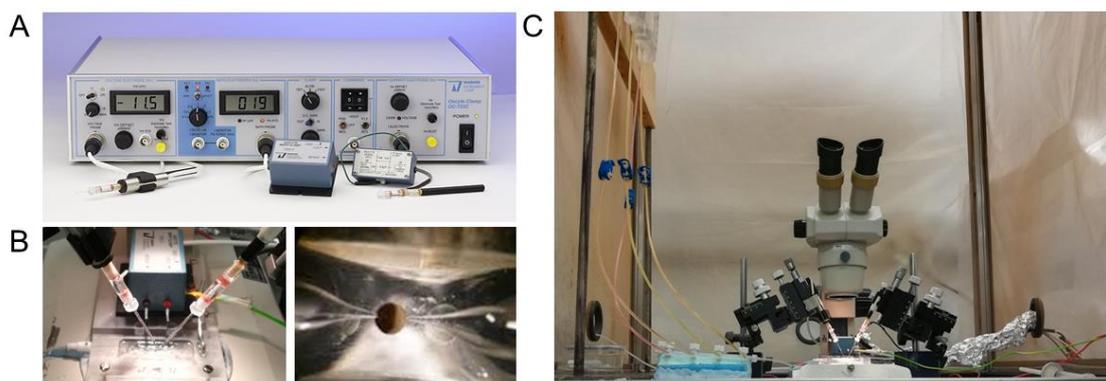


Figura 8. Equipamiento utilizado en TEVC manual. A- Amplificador Oocyte Clamp OC-725C. **B-** Ovocito situado en la cámara de perfusión con los dos microelectrodos insertados en su membrana. **C-** Equipo completo montado sobre la mesa antivibratoria y rodeado por la caja de Faraday.

4.4.4. TEVC automatizado

Se utilizó un equipo de TEVC automatizado denominado HiClamp (Multi Channel Systems, Alemania), que consiste en un sistema de alto rendimiento especialmente diseñado para el cribado o

screening de drogas utilizando ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión (Figura 9). Las corrientes fueron adquiridas y analizadas con el software Data Mining (Multi Channel Systems, Alemania). Los ovocitos fueron dispuestos de forma manual en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos, y desde allí fueron aspirados automáticamente de a uno por vez para ser colocados en un pequeño soporte o canastilla metálica. Los microelectrodos descendieron hasta insertarse en el ovocito, y el voltaje de los mismos fue llevado a 0 mV. Luego el V_m fue establecido en -60 mV para operar en modo *voltage-clamp*. A diferencia del TEVC manual donde el ovocito se encontraba fijo en la cámara y allí se le aplicaban las soluciones, la canastilla del HiClamp con el ovocito empalado se movilizó físicamente hacia los pocillos de otra placa que contenía las diferentes soluciones de interés (Figura 9B). Tras cada exposición, el soporte con el ovocito retornó a la cámara central donde fue lavado con solución SOS perfundida por una bomba peristáltica. Las principales ventajas del HiClamp radican en su sistema de agitación magnética de las soluciones, el cual asegura una rápida perfusión a la totalidad del ovocito, y en el uso de pequeños volúmenes de solución reutilizable (~ 200 μ L). Todos los ensayos electrofisiológicos con TEVC automatizado fueron realizados a temperatura ambiente, y con un tiempo de lavado de 3 minutos con *buffer* SOS entre las exposiciones al agonista y/o a la droga, para garantizar la reproducibilidad entre los registros. El tiempo de lavado fue menor al requerido en los ensayos con TEVC manual gracias a la mayor velocidad de perfusión del *buffer* y al sistema de agitación magnético que posee el equipo HiClamp.

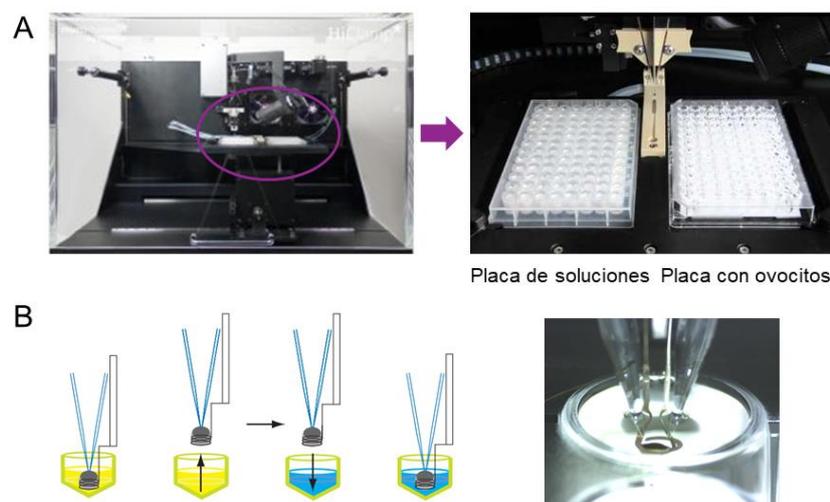


Figura 9. Equipamiento utilizado en TEVC automatizado. A- Equipo HiClamp con las placas de 96 pocillos de soluciones a la izquierda y de ovocitos a la derecha. B- Esquema del mecanismo de funcionamiento del sistema automatizado, donde el ovocito empalado por los dos microelectrodos se moviliza en una canastilla hacia los pocillos con las soluciones a evaluar.

4.4.5. Análisis de las corrientes macroscópicas

Las curvas de concentración-respuesta para el agonista ACh en los distintos receptores fueron generadas normalizando los picos de corriente a las distintas concentraciones de ACh por el valor del

pico de corriente a la concentración que indujo la máxima respuesta en el mismo ovocito (ACh 1 mM en el caso del receptor $\alpha 7$). Para las curvas de concentración-respuesta de los PAMs se utilizó ACh 30 μ M coaplicada con las diferentes concentraciones de la droga moduladora. Dicha concentración de agonista se corresponde aproximadamente con la concentración efectiva (CE) que evoca un 20 % de la respuesta máxima (CE_{20}) en los receptores evaluados. El uso de una concentración submáxima de agonista garantiza una correcta detección y medición de las corrientes que sean moduladas positivamente por las drogas. Los picos de corriente para la combinación de agonista y modulador se normalizaron por el valor del pico de corriente evocado por ACh 30 μ M en el mismo ovocito. Todas las curvas de concentración-respuesta fueron ajustadas con el software Prism 5.0 (GraphPad, EE.UU.) por un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados, acorde con la ecuación de Hill (Hill, 1910):

$$I = I_{max}/[1 + (CE_{50}/x)^n]$$

donde I_{max} es el pico máximo de corriente, CE_{50} es la concentración del ligando a la cual se obtiene el 50 % del pico máximo de corriente (concentración efectiva 50), x es la concentración del ligando y n es el coeficiente de Hill.

5. ENSAYOS EXPERIMENTALES EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS

5.1. Cultivo celular

Se utilizaron células epiteliales humanas embrionarias de riñón de las líneas celulares HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) y BOSC23, siendo esta última una línea HEK293 modificada (Pear *et al.*, 1993). Las células se cultivaron a 37 °C bajo una atmósfera controlada de 5 % de CO_2 , en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina y estreptomycin).

5.2. Expresión heteróloga de receptores

Las líneas celulares HEK293 y BOSC23 fueron empleadas como un sistema de expresión heterólogo para los nAChRs. Los mismos fueron expresados en las células de forma transitoria a través del método de transfección por precipitación con fosfato de calcio (Bouzat *et al.*, 1994). Para ello se generó un precipitado con complejos de fosfato de calcio y los ADNc de interés, mezclando lentamente una solución *buffer* salina de HEPES con una solución de cloruro de calcio conteniendo los ADNc. El tamaño del precipitado formado resultó de gran importancia para garantizar la eficiencia de la transfección, siendo variables a controlar con precisión la cantidad del ADNc, el tiempo de formación del precipitado, la temperatura y el pH. Se utilizaron 4-5 μ g del ADNc por cápsula de Petri de cultivo celular (35 mm), temperatura de los reactivos a 37 °C, tiempo de incubación de 20-30 minutos a temperatura ambiente y pH 7,05. El precipitado luego se esparció sobre las células cultivadas (50-60

% de confluencia), las cuales fueron incubadas durante 8-18 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Pese a que el mecanismo no está completamente dilucidado, se presume que el fosfato de calcio forma un complejo con el ADNc neutralizando sus cargas, facilitando de este modo su adsorción sobre la superficie celular y su posterior endocitosis. La transfección finalizó con el cambio del medio de cultivo y las células transfectadas fueron utilizadas para experimentación uno a tres días después, cuando se alcanzó el máximo nivel de expresión de los receptores en la membrana celular.

Los ADNc de las subunidades no enlazadas y concatenadas de los nAChRs fueron cotransfectados con los ADNc de las chaperonas específicas, Ric-3 y NACHO, para incrementar el nivel de expresión de los receptores en la membrana (subunidad/receptor : Ric-3 en relación 1 : 4 o subunidad/receptor : Ric-3 : NACHO en relación 1 : 1 : 1) (Williams *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2016). Asimismo, al combinar subunidades no concatenadas como $\alpha 7$ y $\beta 2$ se utilizaron proporciones 1 : 8 o 1 : 10 respectivamente, con el objetivo de favorecer la expresión de los receptores $\alpha 7$ heteroméricos sobre la estequiometría homomérica. Para el receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A HC no se requirieron chaperonas adicionales.

Para los experimentos de electrofisiología, las células fueron a su vez cotransfectadas con el ADNc de la GFP en proporción 1 : 10 con respecto al ADNc de las chaperonas y del receptor de interés. De este modo, las células fluorescentes en verde tras exposición a la luz ultravioleta fueron seleccionadas para llevar a cabo los registros electrofisiológicos, ya que presentaban una alta probabilidad de haber incorporado el ADNc que codifica para el receptor (Figura 10). Además, el porcentaje de células fluorescentes con respecto al total de células observadas por contraste de fase permitió verificar la eficiencia del método de transfección utilizado.

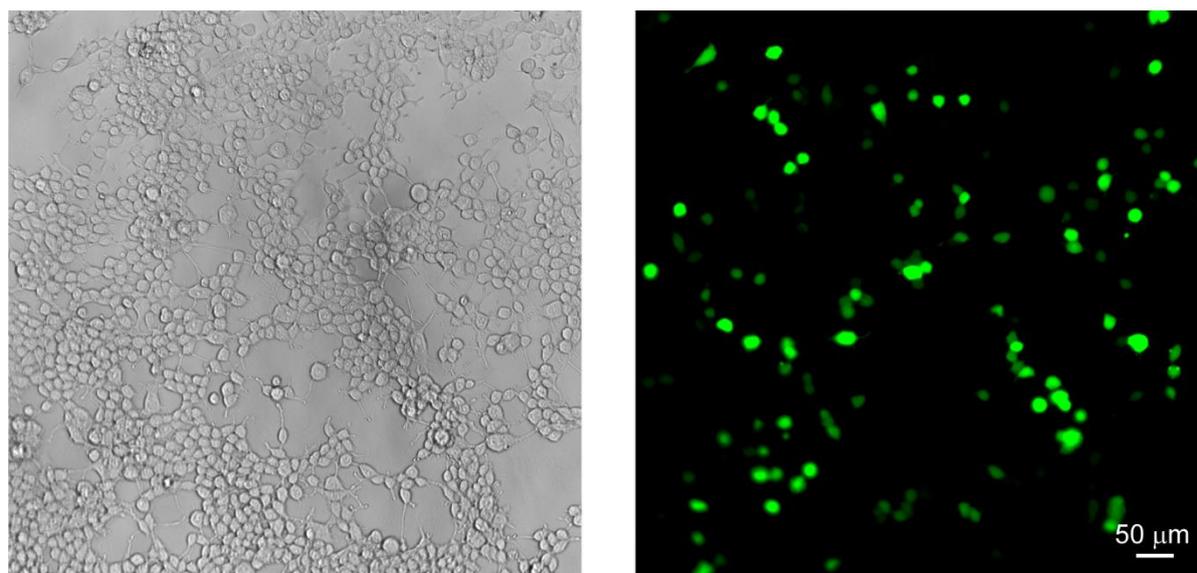


Figura 10. Células BOSC23 transfectadas por precipitación con fosfato de calcio. Se observan por microscopía de campo claro (izquierda) y fluorescencia (derecha). Las células fluorescentes verdes que expresan GFP fueron seleccionadas para los experimentos electrofisiológicos.

5.3. Electrofisiología: *patch-clamp*

Originariamente, la técnica de *patch-clamp* fue desarrollada por los doctores Neher y Sakmann en 1976, con el objetivo de detectar las corrientes iónicas a través de uno o más canales iónicos en una porción de la membrana plasmática denominada parche o “*patch*”, en configuración *voltage-clamp* (Neher y Sakmann, 1976). A diferencia de TEVC, la técnica de *patch-clamp* puede aplicarse a células de menor tamaño porque utiliza un único electrodo a través del cual se mide el potencial de la membrana y se inyecta la corriente, realizando un cambio rápido entre ambas mediciones en forma electrónica. Este método electrofisiológico permite la detección de corrientes microscópicas o unitarias (corriente iónica a través de un canal único) y de corrientes macroscópicas (corriente iónica a través del total de canales iónicos de la célula), manteniendo controlado el voltaje de la membrana plasmática (*voltage-clamp*). Existen diferentes configuraciones de la técnica de *patch-clamp* que incluyen: *cell-attached*, *inside-out* y *outside-out* para el registro de corrientes unitarias, y *whole-cell* para el registro de corrientes macroscópicas (Hamill *et al.*, 1981).

La técnica se basa en la formación de un pequeño parche o “*patch*” de membrana plasmática aislado, a través de la formación de un fuerte sello entre la membrana celular y el microelectrodo de vidrio, denominado pipeta o microelectrodo de *patch-clamp*. La resistencia eléctrica del sello debe ser lo suficientemente alta para permitir detectar las corrientes iónicas unitarias en el parche, aislándolas del ruido eléctrico exterior. Los sellos con una resistencia del orden de los $10^9 \Omega$ ($G\Omega$), denominados “gigasellos”, se obtienen mediante la aplicación de presión negativa (pequeña succión) a través de la pipeta cuando la misma se localiza sobre la superficie celular. El sello constituye entonces el componente de mayor resistencia dentro del circuito de resistencias en serie, de modo que al fijar un voltaje constante a ese pequeño parche (modo *voltage-clamp*), la corriente iónica detectada con el amplificador efectivamente refleja la corriente microscópica que fluye a través de los canales iónicos presentes en esa porción de membrana (del orden de 10^{-12} A). Esta configuración de la técnica se denomina *cell-attached*, y representa la forma menos invasiva y más fisiológica de detección de las corrientes de canal único, puesto que se conserva intacto el ambiente citosólico. Las desventajas radican en la imposibilidad de medir el potencial de membrana en reposo y de cambiar soluciones a ambos lados del parche durante el experimento.

Partiendo de la configuración *cell-attached* se pueden obtener las demás configuraciones de *patch-clamp* (Figura 11). La configuración *inside-out* se obtiene al retirar la pipeta con el sello formado en *cell-attached*, escindiendo el parche, pero manteniendo la integridad del gigasello. La porción de membrana intracelular queda expuesta hacia la solución del baño, lo que permite controlar la composición del lado citosólico al momento de registrar las corrientes a nivel de canal único. La

desventaja radica en la pérdida de factores citosólicos que puedan resultar esenciales en el funcionamiento de los canales.

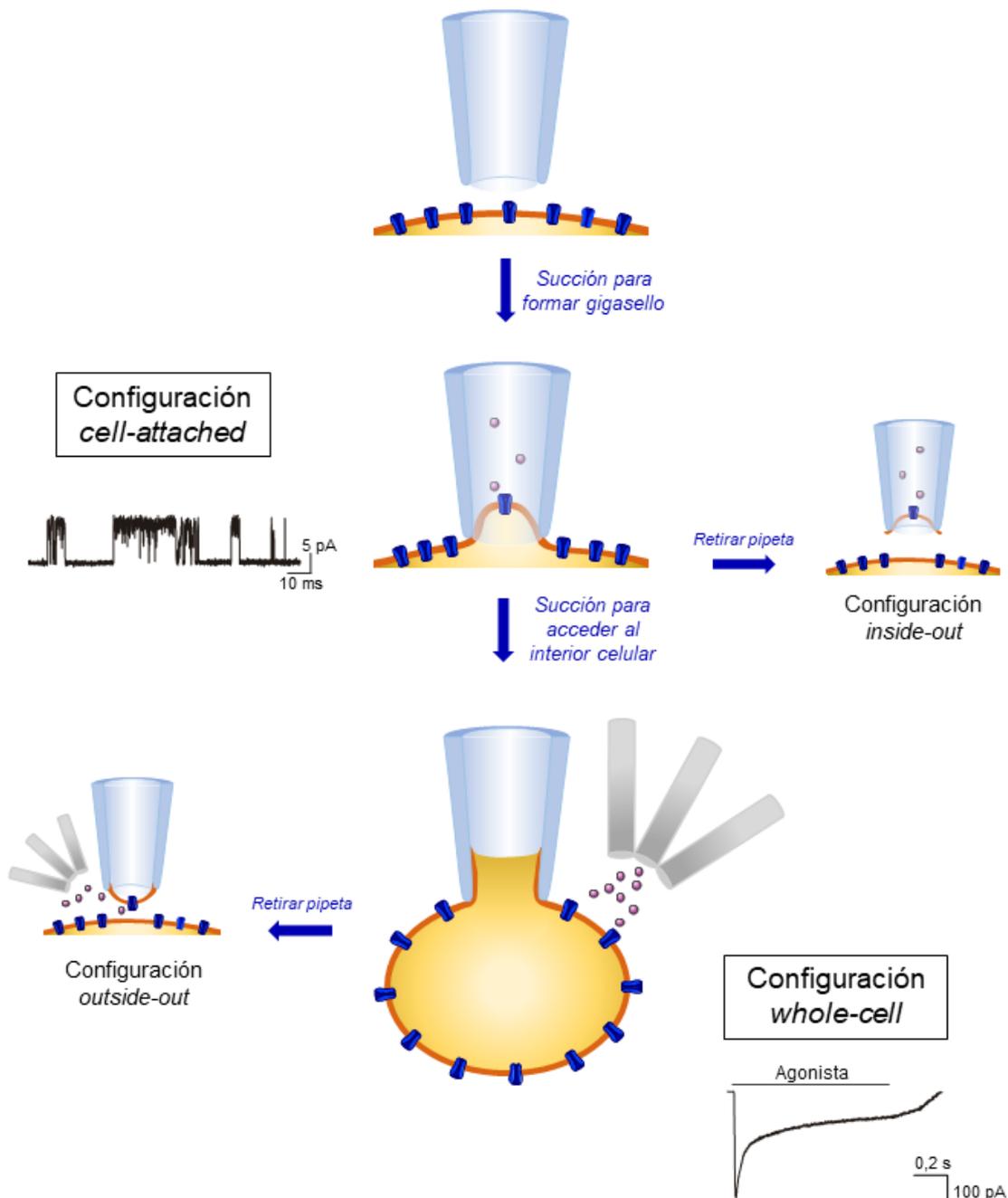


Figura 11. Configuraciones de la técnica de *patch-clamp*. Esquema de la secuencia de obtención de las diferentes configuraciones, remarcando las utilizadas en este trabajo de tesis: *cell-attached* y *whole-cell*. Se muestran registros representativos de cada una de ellas.

Partiendo de *cell-attached*, otra alternativa es romper el parche al aplicar un pulso de succión intenso a través de la pipeta, permitiendo el acceso al interior celular y obteniendo una configuración denominada *whole-cell*. Esta maniobra no compromete la integridad del gigasello entre la pared de la pipeta y la membrana plasmática, previniendo corrientes de pérdida o el ingreso de solución de extracelular al interior celular. En esta configuración se puede registrar la corriente macroscópica, es

decir, la corriente del total de los canales iónicos de la célula entera, en modo *voltage-clamp*. Como ventaja, permite cambiar fácilmente la solución extracelular (con un sistema de perfusión), y como desventaja, se inhabilita el cambio de la solución intracelular y con el tiempo puede ocurrir dilución de los factores citosólicos por la solución de pipeta.

Finalmente, partiendo de la configuración *whole-cell* y retirando la pipeta de la célula, se obtiene la configuración ***outside-out***, donde la porción extracelular de la membrana queda expuesta a la solución del baño, y la porción intracelular, a la solución de pipeta. De este modo se pueden registrar corrientes a nivel de canal único, con la posibilidad de modificar fácilmente la composición del medio extracelular con un sistema de perfusión. Como desventaja, se pierden los factores citosólicos. En el presente trabajo de tesis, los ensayos electrofisiológicos en células HEK293 y BOSC23 fueron realizados por *patch-clamp* en las configuraciones ***cell-attached*** y ***whole-cell***, para registrar corrientes microscópicas o unitarias y corrientes macroscópicas respectivamente.

5.3.1. Microelectrodos

Los microelectrodos o pipetas de *patch-clamp* se realizaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato (Kimble Chase, México) con un *puller* modelo P-97 (Sutter Instruments, Novato, EE.UU.) y sus terminaciones en punta fueron posteriormente suavizadas con calor. La resistencia de las pipetas varió entre 5-7 M Ω . Para los registros en configuración *cell-attached* los microelectrodos fueron recubiertos con un material siliconado denominado Sylgard, con el objetivo de reducir la capacitancia de la pipeta de vidrio dentro de la solución y de este modo disminuir el ruido del sello.

5.3.2. Equipamiento

Las corrientes iónicas fueron detectadas y amplificadas con un amplificador Axopatch 200B o 200A (Molecular Devices, EE.UU.), y digitalizadas a través de una interfaz PCI-6111E (National Instruments, Austin, EE.UU.) Las células se visualizaron mediante un microscopio invertido con sistema de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS100 o Zeiss Axiovert S100) y el acercamiento de la micropipeta a la superficie celular se realizó mediante micromanipuladores PatchMan (Eppendorf, Hamburg, Alemania) o PatchStar (Scientifica, Reino Unido). Estos equipos se ubicaron sobre mesas antivibratorias recubiertas por cajas de Faraday (Figura 12).

5.3.3. Corrientes microscópicas o unitarias: configuración *cell-attached*

5.3.3.1. Soluciones

En general se utilizaron soluciones de baño y de pipeta de igual composición, similar a la del interior celular. Para el estudio de los distintos nAChRs, la solución contenía KCl 142 mM, NaCl 5,4 mM,

CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,7 mM y HEPES 10 mM, pH = 7,4 ajustado con KOH. Únicamente para el receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A HC la solución fue libre de Mg⁺² y con baja concentración de Ca⁺² (0,2 mM CaCl₂), con el objetivo de minimizar el bloqueo que los cationes divalentes ejercen sobre dicho canal (Eiselé *et al.*, 1993; Rayes *et al.*, 2005). Ensayos particulares en ausencia de Ca⁺² fueron realizados con una solución de pipeta sin estos iones (KF 80 mM, KCl 20 mM, aspartato de potasio 40 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4 ajustado con KOH) y una solución de baño libre de Mg⁺² y con baja concentración de Ca⁺² (DaCosta *et al.*, 2015).

Los agonistas solos o combinados con moduladores fueron disueltos en la solución de pipeta a partir de las soluciones stock, posibilitando registros de canal único en presencia continua de las drogas de interés. En el caso de los compuestos cuyo stock fue preparado en DMSO, la concentración final del mismo en la solución de pipeta osciló entre 0,1-1,0 % (v/v). Dicho rango de concentración de DMSO no afecta las propiedades de los receptores nicotínicos de interés (Andersen *et al.*, 2016).

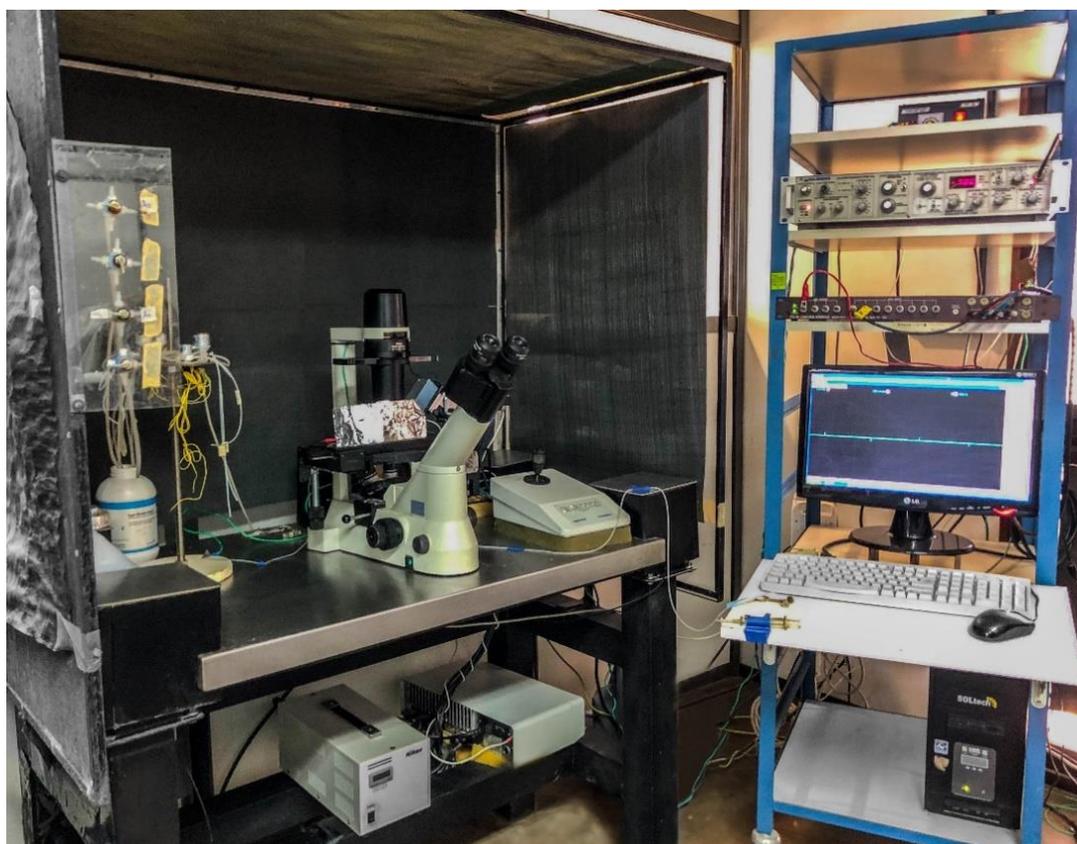


Figura 12. Equipo de *patch-clamp* utilizado para los ensayos electrofisiológicos en células BOSC23. El microscopio invertido y el micromanipulador se ubican sobre una mesa antivibratoria recubierta con una caja de Faraday.

5.3.3.2. Condiciones de obtención del registro de corrientes unitarias

Las corrientes unitarias fueron filtradas a 10 kHz con el amplificador, digitalizadas a 200-100 kHz por medio de la interfaz (intervalos de 5-10 μ s respectivamente) y adquiridas con el software Acquire

(Bruxton Corporation, Seattle, EE.UU.). La mayoría de los registros fueron realizados a temperatura ambiente (20 °C) y a un potencial de membrana de -70 mV.

En los ensayos destinados a evaluar el efecto del incremento de temperatura en la actividad moduladora de ciertos compuestos, los registros fueron realizados a temperaturas más fisiológicas, cercanas a la temperatura corporal (34 ± 3 °C). Para ello, la cápsula de células se colocó en una platina termostalizada, que consiste en un calentador anular de cobre por dentro del cual circula agua caliente procedente de un baño de recirculación de agua Haake D3/L (Thermo Fisher Scientific, Alemania). Este último permite variar la temperatura en un rango de 5 °C a 150 °C con una precisión de 0,02 °C. La temperatura fue monitoreada antes y después de cada sello por medio de un termopar.

En los ensayos destinados a determinar la conductancia de los canales iónicos se realizaron curvas I-V (amplitud de corriente versus voltaje). Para ello se obtuvieron diferentes registros procedentes de un mismo sello a distintos potenciales de membrana.

5.3.3.3. Análisis de las corrientes unitarias

El análisis de las corrientes unitarias fue realizado con el programa TAC X4.2.0 (Bruxton Corporation, Seattle, EE.UU.). En general se les aplicó a los registros un filtro digital Gaussiano de 9 kHz (frecuencia *cut-off* final de 6,7 kHz), excepto en presencia de los compuestos PNU-120596 o 4BP-TQS, donde se utilizó un filtro digital Gaussiano de 3 kHz. Las corrientes microscópicas fueron idealizadas en eventos individuales de apertura y cierre, los cuales se detectaron por el criterio del umbral de amplitud media y se representaron como deflexiones hacia arriba y hacia abajo respectivamente a lo largo de la tesis. Tras la idealización de los registros se construyeron diferentes histogramas que fueron ajustados con funciones matemáticas apropiadas por medio del programa TACFit X4.2.0 (Bruxton Corporation, Seattle, EE.UU.) para el análisis de amplitud y el análisis cinético de los canales iónicos.

En el análisis de amplitud todos los eventos fueron detectados sin discriminar su amplitud y posteriormente se construyeron los histogramas de nivel para este parámetro. Estos fueron ajustados por el método de la máxima probabilidad mediante una función gaussiana con uno o más componentes sumados, cada uno con su amplitud promedio, desviación estándar y área relativa. Debido a la falta de resolución temporal de los eventos de activación breves del receptor $\alpha 7$, para determinar su máxima amplitud se construyeron histogramas considerando sólo los eventos con duraciones mayores a 0,3-1,0 ms (Andersen *et al.*, 2013). Tras determinar la amplitud promedio del receptor a diferentes potenciales de membrana se graficaron curvas I-V, lo que permitió calcular la conductancia del canal iónico, la cual se corresponde con la pendiente de la recta.

En el análisis cinético se construyeron inicialmente histogramas de duraciones de estado abierto y de estado cerrado para todos los eventos detectados, y posteriormente histogramas de duración de los episodios de activación sostenidos, ya sean de *bursts* y/o de *clusters*. Los histogramas de duración

se representaron gráficamente con el tiempo de duración de los eventos en escala logarítmica en el eje de las abscisas y la raíz cuadrada del número de eventos en el eje de las ordenadas. Todos ellos fueron ajustados mediante la suma de componentes de una función exponencial, cada uno con su constante de tiempo τ y su área relativa, por el método de la máxima probabilidad.

En el histograma de estado abierto se determinaron las duraciones de las aperturas del receptor, reportándose siempre el componente de mayor duración o de mayor lentitud, denotado en la presente tesis como τ_{open} . El histograma de estado cerrado fue construido por su utilidad en la posterior delimitación de los episodios sostenidos de activación (*bursts* y *clusters*). Un *burst* se define como un conjunto o serie de aperturas y cierres rápidos y sucesivos generados por una única molécula de receptor. Si bien existen diferentes mecanismos propuestos, es probable que la molécula de agonista permanezca unida al receptor durante la duración del *burst*. Para algunos receptores y/o en presencia de ciertos moduladores se observan *clusters*, los cuales se definen como episodios de activación sostenidos de larga duración constituidos por dos o más *bursts* agrupados, también generados por una única molécula de receptor. En general, los *clusters* y/o *bursts* están separados entre sí por periodos prolongados sin actividad que se corresponderían con estados desensibilizados. La aparición de episodios de activación sostenidos en *bursts* o *clusters* depende de las propiedades cinéticas de cada receptor y de su modulación farmacológica, por lo tanto, no todos los canales exhiben ese comportamiento en todas las condiciones.

El grado de expresión variable de los canales en un sistema heterólogo afecta las constantes de tiempo de estado cerrado de mayor duración, ya que pueden ser artefactualmente mayores o menores según si el número de canales en el parche es bajo o elevado respectivamente, por lo cual no fueron reportadas en el presente trabajo de tesis. Sin embargo, no se ve afectada la constante de tiempo del estado cerrado de menor duración dentro del *burst*, lo que permite determinar un tiempo crítico ($\tau_{crítico}$) que se define como el tiempo de intersección entre el componente más prolongado dentro del *burst* (representa los cierres breves dentro del *burst*) y el componente siguiente fuera del *burst* (representa los cierres largos que separan los *bursts* entre sí). Del mismo modo se procedió para determinar el $\tau_{crítico}$ que asegure una clara diferenciación entre los cierres entre *bursts* dentro de un mismo *cluster*, de aquellos cierres prolongados fuera del *cluster*, para lo cual fue imprescindible la obtención de registros con moderada actividad.

Tras la obtención de los tiempos críticos se construyeron los histogramas de *bursts*, donde los mismos quedaron definidos como una serie de aperturas sucesivas separadas entre sí por períodos de cierre con duraciones inferiores al $\tau_{crítico}$. Por lo tanto, el conjunto de aperturas o *burst* quedó flanqueado por períodos de cierre con duraciones superiores al $\tau_{crítico}$. En estos histogramas se determinó la duración de los episodios de activación sostenidos o *bursts* como la constante de tiempo

del componente de mayor duración o de mayor lentitud, la cual fue denotada en la presente tesis como τ_{burst} . De igual forma se construyeron los histogramas de *clusters* y se determinó su constante de tiempo a partir del componente con mayor duración del histograma ($\tau_{cluster}$).

5.3.4. Corrientes macroscópicas: configuración *whole-cell*

5.3.4.1. Soluciones

La pipeta fue llenada con solución intracelular (ICS, *Intracellular Solution*), la cual contenía KCl 134 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM, pH = 7,3 ajustado con KOH. La solución del baño o solución extracelular (ECS, *Extracellular Solution*) contenía NaCl 150 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM, pH = 7,3 ajustado con KOH. Los agonistas solos o combinados con moduladores fueron disueltos en ECS a partir de las soluciones stock, para ser aplicados sobre las células mediante un sistema de perfusión. En el caso de los compuestos cuyo stock fue preparado en DMSO, la concentración final del mismo en la solución de perfusión fue inferior al 0,1 % (v/v). Dicha concentración no afecta las propiedades de los receptores nicotínicos en estudio (Andersen *et al.*, 2016).

5.3.4.2. Condiciones de obtención del registro de corrientes macroscópicas

Las corrientes macroscópicas fueron registradas a temperatura ambiente y a un potencial de membrana de -50 mV, filtradas a 5 kHz por el amplificador, digitalizadas a 20 kHz por medio de la interfaz y adquiridas con el software WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, Reino Unido). Para la aplicación de las soluciones sobre las células se empleó un sistema de perfusión rápido, compuesto por reservorios de soluciones suspendidos por encima del equipo, para favorecer su flujo a través de mangueras por gravedad hasta alcanzar un conjunto de válvulas controladas por el software de adquisición de las corrientes. Tras ser habilitado el flujo por una dada combinación de encendido de válvulas, las soluciones continuaron su circulación por tubos muy finos (diámetro inferior a 0,3 mm) cuyo extremo fue situado ligeramente por encima del plano focal de las células en la cápsula de cultivo. Esta terminación del sistema de perfusión contenía tres de estos tubos orientados de forma contigua, separados entre sí por ángulos de 45° (Figura 11).

El tiempo de intercambio de soluciones fue estimado por el protocolo de *open pipette*, el cual consistió en colocar el extremo abierto de una pipeta cargada con ICS en la proximidad del flujo de perfusión y modificar sucesivamente las soluciones perfundidas (ECS y sus diluciones al ½ y al ¼), provocando un cambio en el potencial de unión líquida. Se definió como tiempo de intercambio de soluciones a aquel requerido para producir entre el 20-80 % del cambio total, y varió en un rango entre 0,1-1,0 ms (Corradi *et al.*, 2009). Debido a la mayor superficie y curvatura de la célula en comparación al extremo aislado de la pipeta, se estima que el tiempo de intercambio de soluciones en la

configuración *whole-cell* pudo ser entre 3-10 veces más lento que el determinado por el protocolo de *open pipette* (Zhou *et al.*, 1998).

Mediante un protocolo de coaplicación se evaluó el posible efecto modulador de distintos compuestos sobre las corrientes macroscópicas del receptor $\alpha 7$. Inicialmente se aplicaron 3-5 pulsos de la solución de agonista para evocar corrientes de control, seguidos por 3-5 pulsos con la combinación de agonista más droga para inducir las corrientes experimentales, y finalmente otros 3-5 pulsos con el agonista para verificar la recuperación de las corrientes de control. El protocolo completo fue realizado para cada célula, lo que permitió la normalización de las corrientes experimentales a la corriente de control de la misma célula, independizándose de la variabilidad en el grado de expresión de los receptores. Cada pulso aplicado fue de 1,5 segundos, con una duración total del registro de cada corriente de 2,0 segundos. El tiempo de lavado con ECS fue de 8,0 segundos entre pulsos, permitiendo la recuperación total de las corrientes de control. Estos parámetros fueron seleccionados considerando la cinética rápida de las corrientes macroscópicas del receptor $\alpha 7$ en las células BOSC23 (Corradi *et al.*, 2009; DaCosta *et al.*, 2011; Andersen *et al.*, 2016).

Mediante un protocolo de reactivación de la desensibilización se evaluó la capacidad de ciertos moduladores y/o drogas para reactivar los receptores desde el estado desensibilizado. El protocolo consistió en la aplicación continua del agonista por un período de 3,0 segundos, lo que derivó en la generación de una corriente de control que decayó por la desensibilización de los receptores hasta alcanzar un estado estacionario. Tras los 1,2 segundos iniciales, el compuesto de interés se aplicó durante los 1,8 segundos restantes del registro, observándose o no la generación de una corriente de reactivación. En todos los casos, un período de 8,0 segundos de lavado permitió la recuperación completa de las corrientes de control.

5.3.4.3. Análisis de las corrientes macroscópicas

El análisis de las corrientes macroscópicas fue realizado con el programa ClampFit (Molecular Devices, CA, EE.UU.). Para cada condición se registraron 3-5 trazos en la misma célula, los cuales fueron alineados en el pico máximo y promediados para obtener la corriente macroscópica de control o experimental final. Por un lado, sobre estas corrientes promedio se determinaron los valores del pico máximo y de la carga neta, habiéndose obtenido esta última por integración de la corriente en función del tiempo (área bajo la curva) (Papke y Porter Papke, 2002). Ambos parámetros varían de acuerdo al grado de expresión de los receptores, por lo cual debieron ser normalizados a los valores correspondientes de la corriente de control en la misma célula. Por otro lado, se determinaron las constantes de decaimiento al ajustar las corrientes macroscópicas promedio con una función exponencial doble, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$I(t) = I_{rápido} [exp(-t/\tau_{rápido})] + I_{lento} [exp(-t/\tau_{lento})] + I_{\infty}$$

donde t es el tiempo, $I_{\text{rápido}}$ e I_{lento} se corresponden con el pico máximo teórico de corriente en $t = 0$ con cada decaimiento, I_{∞} es el valor de la corriente en el estado estacionario, y $\tau_{\text{rápido}}$ y τ_{lento} constituyen las constantes de decaimiento del componente rápido y lento respectivamente. Las constantes de decaimiento se expresaron como valores absolutos, pues reflejan una propiedad intrínseca del receptor, independiente del grado de expresión de canales en la célula, no requiriendo entonces de un paso de normalización.

5.4. Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno

Los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) fueron determinados mediante el uso de la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA) (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.). Esta forma reducida y esterificada de la sonda es no fluorescente y permeable a la membrana plasmática. Una vez que ingresa a la célula es clivada por esterasas intracelulares para remover los grupos acetato, y al quedar eléctricamente cargada permanece retenida en el interior celular. Allí es oxidada por distintas sustancias oxidantes a diclorofluoresceína (DCF), la cual emite fluorescencia en forma directamente proporcional a los niveles intracelulares de ROS (LeBel *et al.*, 1992).

Para los ensayos de determinación de la producción de ROS se utilizaron células BOSC23 que expresaban el receptor $\alpha 7$ de forma transitoria en su membrana por transfección previa. Las mismas fueron sembradas a razón de $3 \cdot 10^4$ células por pocillo en placas de 96 pocillos con fondo claro y paredes negras (Nunc, Thermo Fisher Scientific), previamente tratadas con poly-L-ornitina (Sigma Aldrich, EE.UU.). Las células fueron expuestas a diferentes tratamientos experimentales por periodos variables de tiempo en medio DMEM sin suero, y luego incubadas con una solución de DCFDA $10 \mu\text{M}$ en *buffer* fosfato-salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) durante 20-30 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad. Tras dicha incubación se les realizaron dos lavados con PBS y se incubaron por 10-20 minutos adicionales en oscuridad (tiempo de recuperación), para permitir la escisión de la sonda a su forma fluorescente por las esterasas intracelulares. Posteriormente se realizó la medición de la fluorescencia por fluorimetría y microscopía de fluorescencia.

5.4.1. Fluorimetría

Dado que la sonda DCFDA es muy susceptible a la oxidación artefactual por exposición a la luz, en lugar de mediciones por punto final resulta más apropiado cuantificar la tasa de producción de ROS intracelulares en función del tiempo, la cual es descripta únicamente por los niveles celulares de las especies oxidativas (Koopman *et al.*, 2006; Sepúlveda *et al.*, 2013). Por ello se utilizó un lector de placas Fluorskan Ascent FL (Thermo Scientific) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 538 nm para adquirir las señales de fluorescencia cada 1 minuto por un período

total de 30 minutos, durante el cual se mantuvo la linealidad en la generación de ROS (Bian *et al.*, 2015). La tasa de producción de ROS se obtuvo al calcular la pendiente de las curvas de fluorescencia de DCF en función del tiempo ajustadas por regresión lineal ($r^2 \sim 0,96-0,99$). Durante el ensayo cinético se realizaron controles de sonda (pocillos únicamente con DCFDA 10 μM) y controles positivos (células cargadas con DCFDA expuestas a H_2O_2 1 mM) para verificar el correcto funcionamiento de la sonda (Sepúlveda *et al.*, 2013; Bian *et al.*, 2015).

5.4.2. Microscopía de fluorescencia

Si bien la cuantificación de la tasa de producción de ROS fue realizada por fluorimetría, en paralelo se adquirieron imágenes de células bajo las mismas condiciones en cápsulas de Petri con un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE 2000 (Nikon Instruments Inc., Melville, EE.UU.). La totalidad de las células cargadas exhibieron fluorescencia en verde, manifestando distinta intensidad en función de los niveles intracelulares de ROS. Las fotografías fueron tomadas tras los tratamientos y la carga con la sonda DCFDA, lo cual coincide con el tiempo inicial de la medición cinética cuantitativa llevada a cabo por fluorimetría (0 minutos).

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar (SD, *Standard Deviation*) o el promedio \pm el error estándar de la media (SEM, *Standard Error of the Mean*). Con la letra *n* se denotó al número de experimentos independientes, el cual se corresponde con el número de ovocitos o de células utilizados en los ensayos experimentales. Con la letra *N* se denotó al número de repeticiones del experimento, el cual se corresponde con el número de ejemplares de *Xenopus laevis* a partir de los cuales se extrajeron los ovocitos o con el número de transfecciones celulares realizadas. En la presente tesis, los valores de *n* y *N* fueron reportados junto a sus respectivos datos experimentales en las tablas o en el texto.

Los conjuntos de datos se sometieron al test de Shapiro-Wilk para evaluar normalidad y al test de Levene para evaluar igualdad de varianzas. Habiendo verificado ambos postulados, la significancia estadística entre dos grupos fue determinada por la prueba t-Student a dos colas y para comparaciones entre más de dos grupos se utilizó ANOVA de una vía, seguido por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Todos los test estadísticos fueron realizados con el programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software, EE.UU.). Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron para valores $p < 0,05$ utilizando uno, dos o tres símbolos (generalmente asteriscos*) para indicar valores $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ y $p < 0,001^{***}$ respectivamente.

CAPÍTULO I

ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha 7$ HOMOMÉRICO

- Parte I:

Mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica

- Parte II:

Modulación alostérica por flavonoides

- Parte III:

Modulación alostérica por derivados de 1,2,3-triazol funcionalizados con grupos fosfonato

CAPÍTULO I

ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha 7$ HOMOMÉRICO

INTRODUCCIÓN

Los **receptores $\alpha 7$ homoméricos** constituyen un potencial **blanco farmacológico** por su ubicua expresión en células neuronales y no neuronales del SNC, principalmente en hipocampo, corteza, tálamo y distintas áreas límbicas subcorticales implicadas en los procesos fisiológicos de **cognición, memoria, aprendizaje, atención y vías de recompensa** (Albuquerque *et al.*, 2009; Lendvai *et al.*, 2013; Bouzat *et al.*, 2018). Diversas condiciones patológicas como desórdenes neurológicos, neurodegenerativos e inflamatorios se presentan con una disfunción en la señalización colinérgica, en muchos casos mediada por $\alpha 7$, cuyos niveles de expresión y/o actividad se encuentran disminuidos. Por lo tanto, el desarrollo de fármacos o drogas capaces de activar o modular alostéricamente al receptor $\alpha 7$ resultan claves como estrategia terapéutica.

La activación ortostérica del receptor $\alpha 7$ ha sido la primera estrategia terapéutica explorada, habiéndose desarrollado diversos **agonistas ortostéricos** con una mayor selectividad gracias al conocimiento del farmacóforo para el receptor nicotínico. Actualmente el interés se ha extendido también a los ligandos alostéricos, tanto **agonistas alostéricos** como **moduladores (PAMs)**, ya que los sitios alostéricos de unión resultan evolutivamente menos conservados entre los pLGICs que el sitio ortostérico, permitiendo una mayor diversidad estructural entre los potenciales fármacos (Uteshev, 2014). Particularmente los PAMs constituyen una promisoriosa alternativa terapéutica frente a los agonistas, ya que poseen mayor selectividad, carecen de actividad intrínseca y no promueven la desensibilización del receptor, incrementando la eficiencia de los tratamientos, disminuyendo la tolerancia y minimizando los efectos adversos (Introducción, pág. 37).

La mayoría de los estudios previos han caracterizado las **corrientes macroscópicas** evocadas por el receptor $\alpha 7$ mediante técnicas electrofisiológicas como TEVC y *patch-clamp* en configuración *whole-cell*, pero los **mecanismos moleculares** subyacentes a los procesos de activación y modulación alostérica no han sido completamente dilucidados. Como se mencionó previamente, las principales características del receptor $\alpha 7$ incluyen una rápida cinética de activación y desensibilización, con una alta permeabilidad al ion Ca^{+2} (Séguéla *et al.*, 1993; Albuquerque *et al.*, 1997; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Bouzat *et al.*, 2008) (Introducción, pág. 27). Sin embargo, este comportamiento cinético rápido sólo es inducido por los agonistas ortostéricos, mientras que la activación ejercida por los agonistas alostéricos exhibe un perfil, y por ende un mecanismo molecular, notablemente distinto. Por otra parte, la activación ortostérica rápida del receptor $\alpha 7$ también está sujeta a la modulación positiva por los distintos PAMs, los cuales ejercen mecanismos moleculares de acción diferenciales que aún no han sido totalmente esclarecidos. Hasta el momento se han identificado y reportado diversos

PAMs del receptor $\alpha 7$ con distinta potencia, eficacia y selectividad, cuyos perfiles de corrientes macroscópicas dieron lugar a la **clasificación** actual en dos grupos mayoritarios: **PAMs tipo I**, que incrementan el pico de la corriente macroscópica con mínimos o nulos cambios en la desensibilización, y **PAMs tipo II**, que no sólo incrementan el pico de la corriente, sino que también producen una marcada reducción en la velocidad de desensibilización y/o reactivan receptores desde el estado desensibilizado generando corrientes de reactivación. Se presume que los PAMs y otros ligandos alostéricos provocan estos efectos al modificar las barreras energéticas de las transiciones entre los distintos estados conformacionales del receptor (Introducción, págs. 32-33, Fig. 14). Aún no se ha establecido un correlato claro entre el tipo de PAM y su estructura química, puesto que la diversidad estructural entre los moduladores es muy elevada, probablemente por la posible existencia de más de un sitio alostérico de unión y por la menor conservación de estos sitios entre los receptores.

Es así que, aunque se hayan reportado diversos PAMs prototipo, la búsqueda de **nuevos compuestos** con capacidad de modular positivamente al receptor $\alpha 7$, tanto **naturales** como **sintéticos**, continúa en auge. Por un lado, los extractos naturales constituyen una fuente prometedora por su compleja composición en compuestos bioactivos con diversos usos medicinales. Por otro lado, la síntesis química permite proveer compuestos líder o prototipo y realizar diversas modificaciones de grupos funcionales sobre los mismos, con el objetivo de mejorar la actividad biológica y disminuir los efectos adversos.

Si bien todos estos factores complejizan considerablemente la farmacología del receptor $\alpha 7$ homomérico, también abren infinitas posibilidades para el diseño y optimización de ligandos con un amplio espectro clínico potencial. Por lo tanto, la elucidación de los **mecanismos moleculares diferenciales de activación y modulación alostérica del receptor $\alpha 7$** resulta crucial, ya que el **origen microscópico** de los perfiles de corrientes macroscópicas en presencia de los distintos tipos de PAMs y agonistas alostéricos del receptor $\alpha 7$ aún se desconoce, requiriéndose de estudios electrofisiológicos a nivel de canal único o de corrientes unitarias.

En el presente capítulo de tesis se aborda el estudio de los **mecanismos moleculares de la activación ortostérica y alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico**, así como de la **modulación alostérica** por PAMs prototipo y por compuestos naturales y sintéticos por primera vez caracterizados, combinando enfoques electrofisiológicos a nivel de corrientes macroscópicas y de canal único en diversas condiciones.

OBJETIVOS GENERALES

Dada la potencialidad del receptor $\alpha 7$ homomérico como blanco farmacológico y la complejidad de su activación y modulación farmacológica de bases moleculares aún desconocidas, en el capítulo I de la presente tesis se establecen los siguientes objetivos generales:

- Dilucidar los mecanismos de activación ortostérica y alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico.
- Dilucidar los mecanismos de modulación alostérica positiva por los distintos tipos de PAMs (I y II) del receptor $\alpha 7$ homomérico.
- Determinar la influencia de la temperatura en la modulación alostérica positiva por los distintos tipos de PAMs (I y II) del receptor $\alpha 7$ homomérico.
- Identificar los determinantes estructurales de la modulación alostérica positiva por los distintos tipos de PAMs (I y II).
- Identificar y caracterizar nuevos compuestos, naturales y sintéticos, con actividad moduladora alostérica positiva sobre el receptor $\alpha 7$ homomérico (actividad $\alpha 7$ -PAM).

El **capítulo I** referido a la activación y modulación alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico se subdivide en **tres partes**, cada una con sus objetivos específicos detallados en la correspondiente sección:

- Parte I: mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica del receptor $\alpha 7$, donde se abordan las bases moleculares del accionar de compuestos cuya actividad biológica fue previamente reportada.
- Parte II: mecanismos moleculares del accionar de ciertos compuestos naturales sobre el receptor $\alpha 7$, donde se aborda la actividad $\alpha 7$ -PAM de los flavonoides.
- Parte III: mecanismos moleculares del accionar de nuevos compuestos sintéticos sobre el receptor $\alpha 7$, donde se abordan la síntesis de derivados del triazol con actividad $\alpha 7$ -PAM y distintos estudios de estructura-actividad sobre dichos agentes.

PARTE I: Mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica

Antecedentes y objetivos específicos

La activación ortostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico ha sido extensamente caracterizada, ya que la mayoría de los agonistas reportados, incluyendo el agonista endógeno ACh, actúan por unión al sitio ortostérico presente en la interfaz entre los ECD de dos subunidades adyacentes. Posteriormente se han ido identificando ligandos alostéricos, tanto endógenos como exógenos, con capacidad de modular la actividad del receptor en presencia del agonista ortostérico, como PAMs, NAMs y SAMs; o con capacidad de activar al receptor en ausencia del agonista ortostérico, como los agonistas alostéricos (Introducción, pág. 30, Fig. 13). La parte I del presente capítulo de tesis se enfoca en el estudio de los mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico, utilizando para ello distintos ligandos alostéricos cuyas actividades ya han sido previamente identificadas y reportadas a nivel de corrientes macroscópicas. Como PAMs tipo I se emplearon el 5-HI y el NS-1738, como PAM tipo II al PNU-120596, y como agonista alostérico al 4BP-TQS, el cual en presencia de agonistas ortostéricos se comporta además como PAM tipo II (Figura I.I.1).

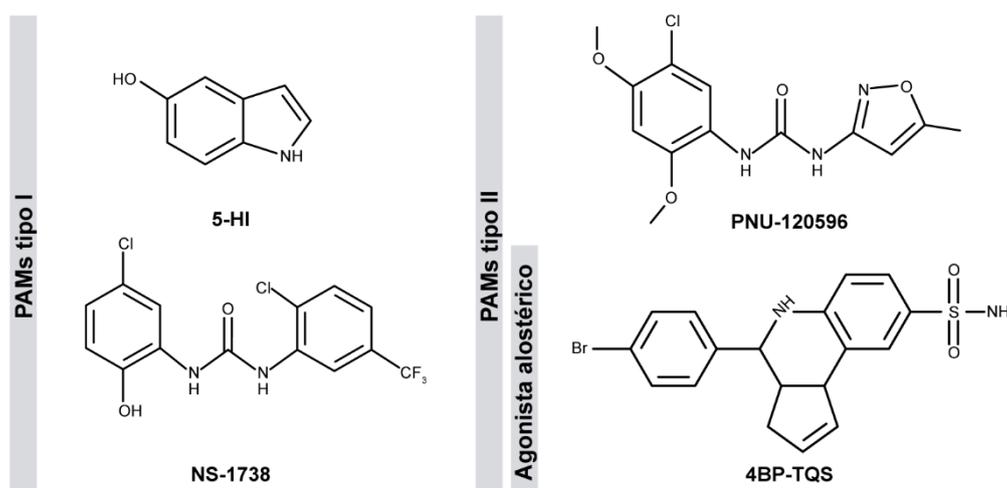


Figura I.I.1. Agonista y moduladores alostéricos del receptor $\alpha 7$ homomérico. Se muestran las estructuras químicas de diversos ligandos alostéricos cuya actividad sobre $\alpha 7$ ha sido previamente reportada y caracterizada principalmente a nivel de corrientes macroscópicas.

El **5-HI**, un metabolito del triptófano reportado previamente como potenciador del receptor 5-HT₃A, es uno de los primeros compuestos identificados como PAM del receptor $\alpha 7$ después de la IVM (Zwart *et al.*, 2002). Es el prototipo de **PAM tipo I**, ya que incrementa las respuestas evocadas por el agonista ortostérico, con nulos o mínimos cambios en la desensibilización del receptor. El **NS-1738** es otro **PAM tipo I** característico que ejerce efectos cognitivos positivos *in vivo* en modelos animales (Timmermann *et al.*, 2007).

El **PNU-120596** es el primer compuesto identificado como **PAM tipo II** (Hurst *et al.*, 2005), pues provoca una potenciación muy marcada del receptor $\alpha 7$, disminuyendo notoriamente la velocidad de

desensibilización y recuperando receptores desde el estado desensibilizado. Los episodios de activación del receptor potenciado por el PNU-120596 resultan de tal duración que el elevado influjo de Ca^{+2} puede provocar citotoxicidad y muerte celular, aunque los resultados son en cierta medida controversiales (Ng *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2012; Guerra-Álvarez *et al.*, 2015). El sitio alostérico de unión del PNU-120596, y al parecer de todos los PAMs tipo II, ha sido propuesto en una **cavidad transmembrana** entre los segmentos M1, M2 y M3, siendo el más consensuado hasta el presente (Young *et al.*, 2008).

El **agonista alostérico 4BP-TQS** se obtiene por modificación química del PAM tipo II TQS (Gill *et al.*, 2011). El sitio alostérico al cual se une el 4BP-TQS se presume en la cavidad del TMD, al igual que para los PAMs tipo II (Gill *et al.*, 2011; Pałczynska *et al.*, 2012), aunque se ha postulado la necesidad de un segundo sitio para que pueda mediar la activación alostérica de forma efectiva (Horenstein *et al.*, 2016).

Los sitios alostéricos no han sido inequívocamente identificados para los distintos ligandos hasta el presente, pero una estrategia válida para el estudio de los **determinantes estructurales de la potenciación** consiste en evaluar el efecto de los moduladores sobre receptores quiméricos y mutantes. El **receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A HC** forma receptores homoméricos funcionales y permite identificar los dominios estructurales del receptor involucrados en la potenciación (Grønlien *et al.*, 2007; Bertrand *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; Collins y Millar, 2010; Andersen *et al.*, 2016). El **receptor quíntuple mutante ($\alpha 7$ TSLMF)** presenta cinco mutaciones puntuales en la cavidad transmembrana (S223T, A226S, M254L, I281M y V288F) que lo tornan insensible a la potenciación por el PAM tipo II PNU-120596 (DaCosta *et al.*, 2011).

Otro aspecto fundamental a evaluar en la modulación alostérica de $\alpha 7$, dada su potencialidad terapéutica, es la **sensibilidad a la temperatura**. La mayoría de los estudios de caracterización electrofisiológica de los PAMs han sido llevados a cabo a temperatura ambiente, pero ciertos reportes de corrientes macroscópicas muestran una disminución de la potenciación ejercida por los PAMs a temperaturas más fisiológicas (Sitzia *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2012). Las bases moleculares subyacentes a esa disminución y la existencia de una dependencia diferencial a la temperatura por parte de los distintos compuestos aún no han sido esclarecidas.

En esta primera parte del capítulo I se analizan los mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico, correlacionando y contrastando los efectos ejercidos a nivel macroscópico y microscópico por ligandos alostéricos previamente reportados (5-HI y NS-1738 como PAMs tipo I, PNU-120596 como PAM tipo II y 4BP-TQS como agonista alostérico) contra la activación ortostérica producida por el ligando endógeno ACh. Por lo tanto, se plantean los siguientes **objetivos específicos de la parte I**:

- Describir y contrastar a nivel de corrientes macroscópicas y unitarias las diferencias entre la activación ortostérica por la ACh y la activación alostérica por el 4BP-TQS.
- Describir y contrastar a nivel de corrientes macroscópicas y unitarias el efecto de los prototipos de PAMs tipo I y II.
- Evaluar la sensibilidad a la temperatura de la potenciación por los prototipos de PAMs tipo I y II.
- Evaluar los determinantes estructurales de potenciación de los prototipos de PAMs tipo I y II utilizando el receptor quáintuple mutante $\alpha 7$ TSLMF.

Resultados

1. ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR HOMOMÉRICO $\alpha 7$

La activación del receptor homomérico $\alpha 7$ por parte de agonistas ortostéricos como la ACh ha sido caracterizada en detalle en estudios previos (Bouzat *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2013). Sin embargo, la activación por agonistas alostéricos como el 4BP-TQS, de más reciente descubrimiento, ha sido explorada en menor medida (Gill *et al.*, 2011; Pałczynska *et al.*, 2012). En esta sección se describe el perfil de corrientes macroscópicas y de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activado por agonistas ortostéricos y alostéricos. Para la realización de estos experimentos la subunidad $\alpha 7$ WT fue expresada de forma heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* y en células BOSC23. En el caso de los ovocitos se coexpresó con la chaperona NACHO en relación 10 : 1 o 20 : 1 en algunos experimentos, mientras que en el caso de las células BOSC23 se coexpresó necesariamente con la chaperona Ric-3 en relación 1 : 4 para favorecer la expresión del receptor en la membrana celular.

1.1. Activación ortostérica por ACh

A nivel de **corrientes macroscópicas**, la ACh induce una corriente de rápida activación y desensibilización en presencia continua del agonista, tanto en ovocitos de *Xenopus* como en células BOSC23 que expresan el receptor $\alpha 7$ (Bouzat *et al.*, 2018). Inicialmente se obtuvieron las corrientes macroscópicas del receptor $\alpha 7$ por TEVC en ovocitos a un potencial de membrana de -60 mV y en un rango de concentraciones de $0,1 \mu\text{M}$ - 1 mM de ACh. Considerando como respuesta al pico de corriente, se construyó la curva de concentración-respuesta, obteniéndose un valor de CE_{50} de $108 \pm 5 \mu\text{M}$ ($n = 10$, $N = 5$, Figura I.1.2), el cual se encuentra en concordancia con los valores de CE_{50} previamente reportados (~ 100 - $200 \mu\text{M}$).

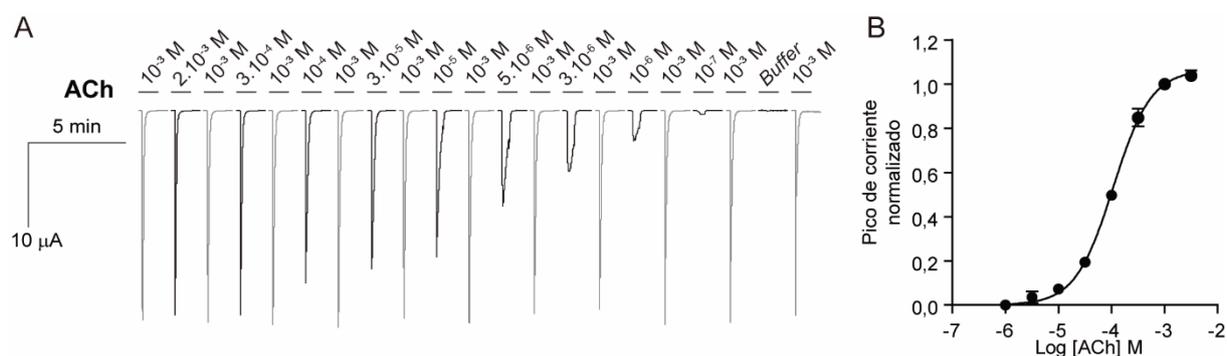


Figura I.1.2. Curva de concentración-respuesta de ACh para el receptor homomérico $\alpha 7$. A- Se observan las corrientes representativas a las distintas concentraciones de ACh (trazos negros) intercaladas con las corrientes de control de ACh 10^{-3} M (concentración de máxima respuesta, trazos grises). B- Curva de concentración-respuesta, siendo la respuesta el pico de la corriente evocada por ACh a una dada concentración normalizado al pico de la corriente de control. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM.

Los ovocitos de *Xenopus* no constituyen un sistema propicio para realizar un análisis cinético de las corrientes macroscópicas, dado que el gran tamaño celular impide la perfusión rápida y simultánea de toda su superficie, derivando en la activación y desensibilización de los canales en diferentes momentos según la localización proximal o distal al sistema de perfusión y la velocidad de aplicación de las soluciones. Particularmente en el caso del receptor $\alpha 7$, para el cual las velocidades de activación y desensibilización son muy rápidas, el análisis cinético de las corrientes macroscópicas obtenidas en ovocitos puede conducir a cometer errores en la determinación de las constantes de decaimiento, las cuales resultan artefactualmente mayores debido a la lentitud en la perfusión del sistema (Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat *et al.*, 2018).

Por estas razones, el análisis cinético fue llevado a cabo sobre las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ obtenidas en células BOSC23 por la técnica de *patch-clamp* en configuración *whole-cell* a un potencial de membrana de -50 mV, ya que el menor tamaño de estas células y su rápida perfusión garantiza una mejor resolución temporal. Si bien las corrientes macroscópicas en ovocitos se obtuvieron a -60 mV de potencial de membrana, en células BOSC23 se realizaron a -50 mV con el objetivo de incrementar la estabilidad y durabilidad de los registros, dado que las células humanas son menos robustas que los ovocitos de *Xenopus*. Esto no influye en las conclusiones obtenidas porque el comportamiento funcional de los nAChRs resulta similar en un rango de potenciales de membrana entre -70 mV y -50 mV. Además, en todos los casos se realizaron las corrientes de control y experimentales en la misma célula y bajo las mismas condiciones para poder efectuar apropiadamente las comparaciones.

Ante la aplicación de ACh $100 \mu\text{M}$, los receptores $\alpha 7$ se activaron rápidamente generando una corriente macroscópica que alcanzó el pico máximo en $\sim 5\text{-}10$ ms para luego decaer en presencia continua del ligando debido al proceso de desensibilización (Figura I.I.3A). La velocidad de decaimiento se ajustó con dos componentes, uno rápido $\tau_{\text{rápido}}$ ($\sim 30\text{-}50$ ms) y uno lento τ_{lento} ($\sim 500\text{-}1000$ ms). Si bien generalmente la velocidad de desensibilización se aproxima a partir de la velocidad de decaimiento, cabe destacar que para el receptor $\alpha 7$ existe una gran variabilidad en estos valores según el sistema experimental empleado y la resolución temporal del intercambio de soluciones. Una velocidad de decaimiento inferior al rango del milisegundo ha sido reportada previamente en configuración *outside-out* con una perfusión rápida de ACh, aunque se estima que el valor real podría ser incluso inferior (Bouzat *et al.*, 2008).

A nivel de **corrientes unitarias o microscópicas**, el receptor $\alpha 7$ se activa mayoritariamente en breves aperturas aisladas en presencia de ACh, y menos frecuentemente en forma de *bursts* de muy corta duración, los cuales consisten en episodios de activación más sostenidos dados por una serie de aperturas sucesivas y rápidas de la misma molécula de receptor, separadas entre sí por períodos de cierre inferiores a cierto $\tau_{\text{crítico}}$ (Bouzat *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2013) (Metodología, pág. 60).

Además, la cinética de activación del receptor $\alpha 7$ por la ACh es independiente de la concentración de agonista, por lo cual las duraciones no exhiben diferencias significativas en un rango de concentraciones de ACh entre $100 \mu\text{M}$ - 1 mM (Bouzat *et al.*, 2008) (Figura I.I.3C).

Se realizaron registros de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activado por ACh $100 \mu\text{M}$ (CE_{50}) por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* y a -70 mV de potencial de membrana para obtener una buena relación de la señal con respecto al ruido (Figura I.I.3B-C). El histograma de estado abierto se ajustó con dos componentes exponenciales, uno mayoritario y más breve de $66 \pm 24 \mu\text{s}$, y uno de mayor duración (τ_{open}) de $274 \pm 11 \mu\text{s}$ ($0,27 \pm 0,01 \text{ ms}$) ($n = 5, N = 5$, Figura I.I.3C). El $\tau_{\text{crítico}}$ fue de $\sim 200\text{-}400 \mu\text{s}$ y se obtuvo a partir de la intersección entre el primer y el segundo componentes del histograma de estado cerrado, los cuales se corresponden con los tiempos de cierre más breves dentro del *burst*, que no varían con el diferente grado de expresión del receptor entre las células. Utilizando ese $\tau_{\text{crítico}}$ en la construcción del histograma de *bursts*, el cual fue ajustado con dos componentes exponenciales, se obtuvo una duración promedio de los *bursts* (τ_{burst}) de $352 \pm 19 \mu\text{s}$ ($0,35 \pm 0,02 \text{ ms}$) ($n = 5, N = 5$, Figura I.I.3C).

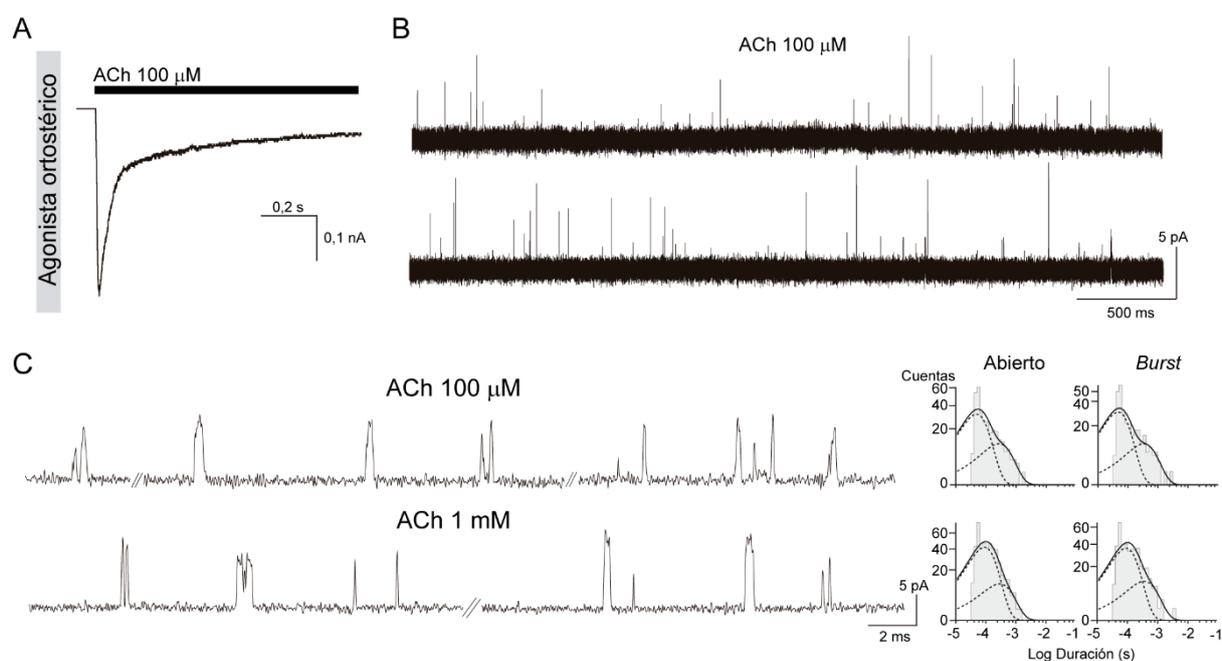


Figura I.I.3. Activación ortostérica del receptor homomérico $\alpha 7$ por ACh. **A-** Corriente macroscópica representativa en presencia continua de ACh $100 \mu\text{M}$. Potencial de membrana: -50 mV . **B-** Registro representativo de corrientes unitarias en presencia de ACh $100 \mu\text{M}$. Las aperturas de los canales se muestran siempre como deflexiones hacia arriba. Filtro: 9 kHz . Potencial de membrana: -70 mV . **C-** Registros representativos de corrientes unitarias en presencia de ACh $100 \mu\text{M}$ y 1 mM donde se observa que la cinética del canal es independiente de la concentración del agonista. Filtro: 9 kHz . Potencial de membrana: -70 mV . A la derecha se muestran histogramas de estado abierto y de *bursts* típicos de cada condición.

Dada la rápida cinética de activación y desensibilización del receptor $\alpha 7$, sus aperturas resultan muy breves y se dificulta la resolución completa de la **amplitud** de las corrientes unitarias. Es así que

en los histogramas de amplitud considerando aperturas con duraciones mayores a 0,03 ms se observan eventos de múltiples amplitudes en lugar de una única amplitud mayoritaria (Andersen *et al.*, 2013). Por esta razón, se restringieron los histogramas de amplitud a eventos con duraciones mayores a 0,3-1,0 ms con el objetivo de favorecer la resolución temporal, observándose un único componente mayoritario que se corresponde con la amplitud completamente resuelta del receptor $\alpha 7$ ($10,01 \pm 0,34$ pA, $n = 6$, $N = 5$).

1.2. Activación alostérica por 4BP-TQS

Contrariamente a los agonistas ortostéricos, los agonistas alostéricos como el 4BP-TQS inducen **corrientes macroscópicas** de $\alpha 7$ con activación lenta y velocidad de desensibilización marcadamente disminuida (Gill *et al.*, 2011; Pałczynska *et al.*, 2012; Lasala *et al.*, 2018) (Figura I.I.4A). Para dilucidar el origen microscópico de dichas observaciones macroscópicas se realizaron registros de **corrientes unitarias** del receptor $\alpha 7$ activado por 4BP-TQS $10 \mu\text{M}$ por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* a -70 mV de potencial de membrana (Figura I.I.4B). Se observaron aperturas muy prolongadas y una alta frecuencia de episodios de activación sostenidos de muy larga duración denominados *clusters*, los cuales se componen de varios *bursts* agrupados (Metodología, pág. 60). El histograma de estado abierto se ajustó con tres componentes exponenciales, siendo el τ_{open} de $71,71 \pm 37,62$ ms ($n = 4$, $N = 3$, Figura I.I.4B). El $\tau_{\text{crítico}}$ fue de ~ 50 - 100 ms y se obtuvo a partir de la intersección entre el tercer y el cuarto componentes del histograma de estado cerrado. Los períodos de cierre con duraciones mayores a ese $\tau_{\text{crítico}}$ separan los *clusters* entre sí, mientras que los tiempos de cierre con duraciones inferiores al $\tau_{\text{crítico}}$ separan entre sí los *bursts* que forman parte de un dado *cluster*. Utilizando ese $\tau_{\text{crítico}}$ se construyó el histograma de *clusters*, el cual fue ajustado con tres o cuatro componentes para obtener el τ_{cluster} de 1396 ± 539 ms ($n = 4$, $N = 3$, Figura I.I.4). Dado el notorio incremento en el tiempo de estado abierto, la resolución de la amplitud en presencia de 4BP-TQS fue completa y los histogramas se construyeron considerando todos los eventos con duraciones mayores a 0,03 ms, obteniéndose un valor medio de amplitud de $9,94 \pm 0,78$ pA ($n = 3$, $N = 3$, Figura I.I.4).

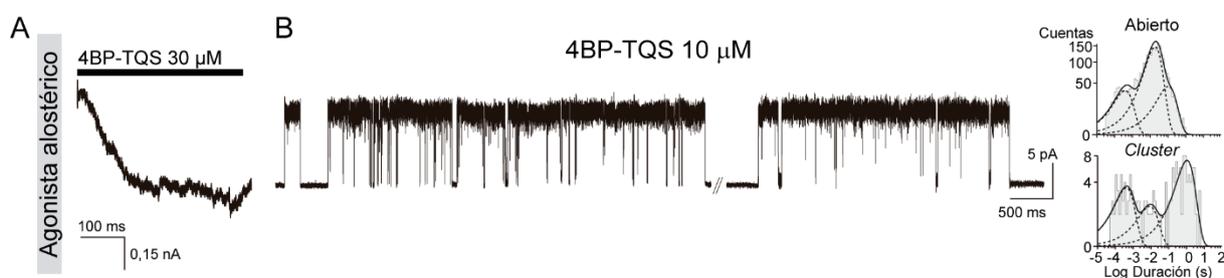


Figura I.I.4. Activación alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico por 4BP-TQS. A- Corriente macroscópica de $\alpha 7$ en presencia de 4BP-TQS $30 \mu\text{M}$ (Modificado de (Lasala *et al.*, 2018)). Potencial de membrana: -50 mV. B- Registro representativo de corrientes unitarias de $\alpha 7$ en presencia de 4BP-TQS $10 \mu\text{M}$. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se muestran histogramas representativos de estado abierto y de *cluster*.

Contrastando la **activación alostérica** del receptor $\alpha 7$ con respecto a la **activación ortostérica**, se observó que la **amplitud** a nivel de canal único se mantuvo constante ($p > 0,05$) y que las **duraciones** de las aperturas y de los eventos de activación sostenidos aumentaron significativamente ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente). Estos últimos consistieron en *bursts* infrecuentes y breves en presencia de ACh, con una duración similar a la de una apertura aislada, mientras que en presencia de 4BP-TQS se prolongaron y agruparon formando *clusters* de muy larga duración (Tabla I.I.2).

2. MODULACIÓN ALOSTÉRICA POSITIVA DEL RECEPTOR HOMOMÉRICO $\alpha 7$

La modulación alostérica positiva del receptor homomérico $\alpha 7$ por diversos compuestos con actividad $\alpha 7$ -PAM ha sido caracterizada mayoritariamente a nivel de corrientes macroscópicas y en menor medida a nivel de corrientes unitarias (Hurst *et al.*, 2005; Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Grønlien *et al.*, 2007; DaCosta *et al.*, 2011). En esta sección se describe el perfil de corrientes macroscópicas y de corrientes unitarias del receptor $\alpha 7$ potenciado por distintos PAMs prototipo previamente reportados, y se analizan los determinantes estructurales de potenciación y la sensibilidad a la temperatura. Para la realización de los experimentos, la subunidad $\alpha 7$ WT fue expresada de forma heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* y en células BOSC23 tal como se describió previamente. Para el análisis de los determinantes estructurales en células BOSC23 se coexpresó la subunidad quintuple mutante $\alpha 7$ TSLMF con la chaperona Ric-3 en relación 1 : 4.

2.1. Modulación alostérica positiva por PAMs tipo I y II

Dada la gran diversidad estructural entre los distintos tipos de PAMs, se seleccionaron dos compuestos prototipo de PAM tipo I, el **5-HI** y el **NS-1738**, y un compuesto prototipo de PAM tipo II, el **PNU-120596** (Figura I.I.1). La elección de dos compuestos representativos de los PAMs tipo I fue debido a sus notorias diferencias estructurales. Mientras que el 5-HI es una molécula de pequeño tamaño, polar y soluble en solución acuosa, el NS-1738 es una molécula de mayor tamaño y más apolar, soluble en solventes orgánicos. De hecho, pese a ser un PAM tipo I, el NS-1738 exhibe una marcada similitud estructural con el prototipo de PAM tipo II PNU-120596 por la presencia de un grupo urea central (Figura I.I.1). Para los distintos ensayos, tanto la ACh como los PAMs fueron utilizados en la concentración correspondiente a su CE_{50} previamente reportada: ACh 100 μM , 5-HI 2 mM (Zwart *et al.*, 2002), NS-1738 10 μM (Timmermann *et al.*, 2007) y PNU-120596 1 μM (Hurst *et al.*, 2005; El Kouhen *et al.*, 2009). Sólo en las corrientes macroscópicas con PNU-120596 se utilizó una concentración mayor (10 μM), para no requerir de un paso previo de preincubación. Los efectos de los PAMs sobre $\alpha 7$ fueron evaluados en células BOSC23 por la técnica de *patch-clamp*, a nivel de corriente macroscópica en configuración *whole-cell* a un potencial de membrana de -50 mV, y a nivel microscópico o de corrientes unitarias en configuración *cell-attached* a un potencial de membrana de -70 mV.

A nivel de **corrientes macroscópicas**, el **5-HI** potenció la corriente evocada por la ACh, incrementando significativamente el pico de corriente en ~ 3 veces ($p < 0,001$, Figura I.I.5A, Tabla I.I.1). La velocidad de decaimiento se ajustó con dos componentes, $\tau_{\text{rápido}}$ de 52 ± 11 ms y τ_{lento} de 567 ± 446 ms, sin diferencias significativas con los componentes respectivos de la corriente de control ($\tau_{\text{rápido}} = 54 \pm 36$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 667 \pm 355$ ms, $p > 0,05$). La carga neta se incrementó en ~ 4 veces ($p < 0,001$), por lo tanto, la relación entre el incremento en la carga neta y el incremento en el pico de corriente (relación carga neta/pico) fue de $\sim 1,50$ (Tabla I.I.1).

Por su parte, el **NS-1738** también potenció significativamente la corriente generada por la ACh, incrementando el pico de corriente en $\sim 1,5$ veces ($p < 0,001$, Figura I.I.5A, Tabla I.I.1). La velocidad de decaimiento se ajustó con dos componentes, $\tau_{\text{rápido}}$ de 67 ± 46 ms y τ_{lento} de 654 ± 371 ms, sin diferencias significativas con los componentes de la corriente de control ($\tau_{\text{rápido}} = 51 \pm 22$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 670 \pm 340$ ms, $p > 0,05$). La carga neta se incrementó en ~ 3 veces ($p < 0,001$), por lo tanto, la relación carga neta/pico fue de $\sim 1,70$ (Tabla I.I.1).

En el caso del **PNU-120596**, su efecto potenciador sobre la corriente de $\alpha 7$ inducida por la ACh fue muy marcado, con un incremento significativo de ~ 30 veces en el pico de corriente y con una notoria disminución en la velocidad de desensibilización ($p < 0,001$, Figura I.I.5A, Tabla I.I.1). Por esa razón, al igual que en numerosos reportes previos, no se determinó numéricamente la velocidad de decaimiento para el PNU-120596, puesto que resulta prácticamente inexistente en presencia del agonista. Ajustar el decaimiento de la corriente al remover el agonista del medio resultaría incorrecto, ya que los receptores estarían experimentando un proceso de desactivación en lugar de un proceso de desensibilización. La carga neta se incrementó en ~ 130 veces ($p < 0,01$), por lo tanto, la relación carga neta/pico fue de $\sim 4,00$ (Tabla I.I.1).

PAM	Pico de corriente (veces)	Carga neta (veces)	Relación carga neta/pico	$\tau_{\text{rápido}}$ (ms)	τ_{lento} (ms)	<i>n</i>	<i>N</i>
5-HI 2 mM	$3,02 \pm 1,09^{***}$	$4,58 \pm 2,42^{***}$	$1,51 \pm 0,46$	52 ± 11	567 ± 446	9	8
NS-1738 10 μ M	$1,49 \pm 0,21^{***}$	$2,59 \pm 0,56^{***}$	$1,70 \pm 0,22$	67 ± 46	654 ± 371	6	3
PNU-120596 10 μ M	$31,15 \pm 20,06^{***}$	$126,84 \pm 90,30^{**}$	$4,07 \pm 0,56$	-	-	5	8

Tabla I.I.1. Modulación alostérica positiva del receptor homomérico $\alpha 7$ por distintos tipos de PAMs a nivel de corrientes macroscópicas. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control (ACh en ausencia de PAMs).

Mediante el protocolo de **reactivación del estado desensibilizado** se evaluó la capacidad de los PAMs para inducir corrientes de reactivación tras la desensibilización en presencia del agonista (Metodología, pág. 62). Tanto el **5-HI** como el **NS-1738** indujeron corrientes de reactivación muy pequeñas, cuyo pico fue de $0,55 \pm 0,16$ veces ($n = 5$, $N = 4$) y $0,57 \pm 0,13$ veces ($n = 6$, $N = 3$) con respecto

a la corriente de control evocada por la ACh respectivamente (Figura I.I.5B). En contraste, el **PNU-120596** generó una corriente de reactivación muy notoria, con un incremento del pico de 10 ± 8 veces con respecto a la corriente de control de la ACh, y con una cinética más lenta, observándose un incremento relativo de la carga neta de $2088 \pm 1767 \%$ ($n = 4, N = 4$) (Figura I.I.5B). Además, como control de este protocolo de reactivación se aplicó un pulso de solución *buffer* ECS sin drogas sobre los receptores desensibilizados y no se registró ninguna respuesta significativa ($0,11 \pm 0,07$ veces con respecto al pico de la corriente de control, $n = 5, N = 4$, Figura I.I.5B).

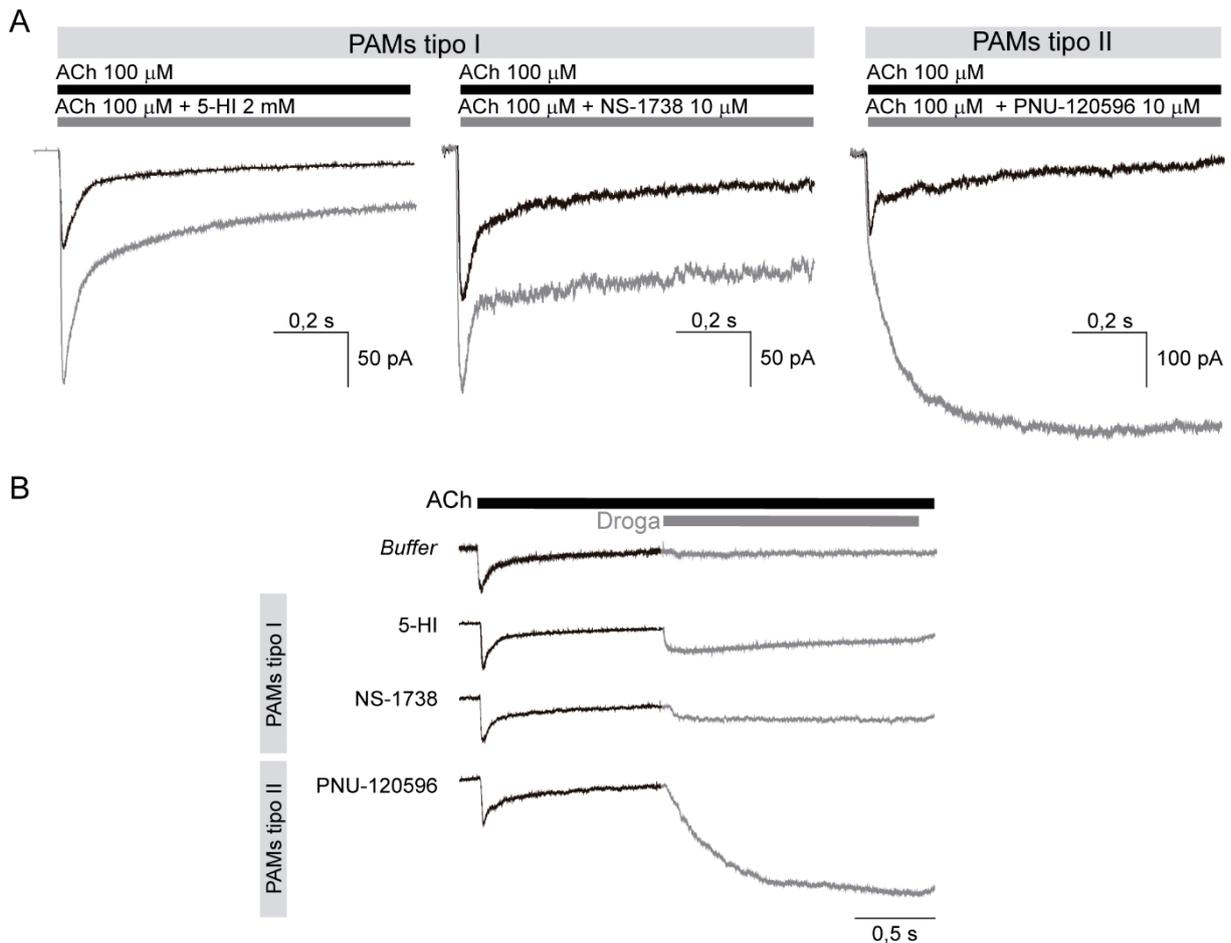


Figura I.I.5. Modulación alostérica del receptor homomérico $\alpha 7$ por PAMs tipo I y II a nivel de corrientes macroscópicas. **A-** Corrientes macroscópicas representativas del receptor $\alpha 7$ activado por ACh 100 μ M en ausencia (trazos negros) y en presencia de los distintos tipos de PAMs (trazos grises). Las barras horizontales en negro y en gris indican los períodos de aplicación del agonista solo y junto con el PAM respectivamente. Potencial de membrana: -50 mV. **B-** Protocolo de reactivación del estado desensibilizado. Las corrientes de control de ACh (trazos negros) fueron normalizadas para poder comparar las corrientes de reactivación (trazos grises) entre las diferentes condiciones. Las barras horizontales en negro y en gris indican los períodos de aplicación del agonista y del PAM respectivamente. Potencial de membrana: -50 mV.

En resumen, el 5-HI y el NS-1738 incrementaron el pico de la corriente macroscópica inducida por la ACh sin modificar significativamente la velocidad de desensibilización (relación carga neta/pico cercana a uno), y fueron incapaces de reactivar de manera efectiva a los receptores desensibilizados.

Por su parte, el PNU-120596 produjo un notorio incremento del pico de la corriente macroscópica generada por la ACh disminuyendo profundamente la velocidad de desensibilización (relación carga neta/pico superior a uno), y exhibió una gran capacidad para reactivar receptores desensibilizados. Todas estas características se encuentran en concordancia con la clasificación reportada de los dos primeros compuestos, 5-HI y NS-1738, como PAMs tipo I y, con el último compuesto, PNU-120596, como PAM tipo II.

A nivel de **corrientes unitarias**, los diferentes tipos de PAMs prolongaron la duración de las aperturas del receptor $\alpha 7$ e indujeron su activación en episodios sostenidos, como *bursts* o *clusters*. En el caso del **5-HI**, las duraciones de las aperturas y de los *bursts* se incrementaron en ~ 8 veces ($p < 0,001$) y ~ 15 veces ($p < 0,001$) respectivamente (Figura I.I.6, Tabla I.I.2). El histograma de estado abierto se ajustó con tres componentes, siendo el τ_{open} de $2,26 \pm 0,33$ ms. En el histograma de estado cerrado, el $\tau_{crítico}$ se obtuvo de la intersección entre el segundo y tercer componentes, con un valor más prolongado ($\sim 2-6$ ms) que en ausencia de PAMs. Considerando dicho $\tau_{crítico}$ se construyó el histograma de *bursts*, el cual se ajustó con tres componentes, siendo el τ_{burst} de $5,20 \pm 0,28$ ms (Figura I.I.6, Tabla I.I.2).

Por su parte, el **NS-1738**, prolongó las duraciones de las aperturas y de los *bursts* en ~ 10 veces ($p < 0,05$) y ~ 50 veces ($p < 0,001$) respectivamente (Figura I.I.6, Tabla I.I.2). El histograma de estado abierto se ajustó con tres componentes, siendo el τ_{open} de $2,91 \pm 0,66$ ms. En el histograma de estado cerrado, el $\tau_{crítico}$ se obtuvo de la intersección entre el tercer y cuarto componentes, con un valor más prolongado que en ausencia de PAMs ($\sim 10-20$ ms). Teniendo en cuenta dicho $\tau_{crítico}$ se construyó el histograma de *bursts*, el cual fue ajustado con tres componentes, siendo el τ_{burst} de $17,53 \pm 2,52$ ms (Figura I.I.6, Tabla I.I.2).

El **PNU-120596** incrementó la duración de las aperturas en ~ 800 veces ($p < 0,001$) e indujo episodios de activación sostenidos en *clusters* de muy larga duración, con un orden temporal superior al segundo. El histograma de estado abierto se ajustó con tres componentes, siendo el τ_{open} de 221 ± 72 ms. En el histograma de estado cerrado, el $\tau_{crítico}$ fue obtenido a partir de la intersección entre el tercer y cuarto componentes, siendo un valor de $\sim 60-100$ ms, notoriamente más elevado que en ausencia de PAMs. Esto se debe a que los periodos de cierres con duraciones mayores a ese tiempo separan entre sí los *clusters*, conformados por varios *bursts* agrupados. El histograma de *clusters* se ajustó con cuatro componentes, siendo el $\tau_{cluster}$ de 1988 ± 718 ms (Figura I.I.6, Tabla I.I.2).

El incremento en la duración de las aperturas del canal en presencia de PAMs permitió la resolución completa de la **amplitud** al construir histogramas para este parámetro con eventos de duraciones mayores a 0,03 ms. Se obtuvo en todos los casos una única población mayoritaria de amplitud sin diferencias significativas ($p > 0,05$) con la amplitud de $\alpha 7$ en ausencia de PAMs, siendo

estos valores de $10,34 \pm 1,11$ pA con 5-HI, $9,83 \pm 0,56$ pA con NS-1738 y $10,24 \pm 0,30$ pA con PNU-120596 ($n = 3$, $N = 3$ en las tres condiciones).

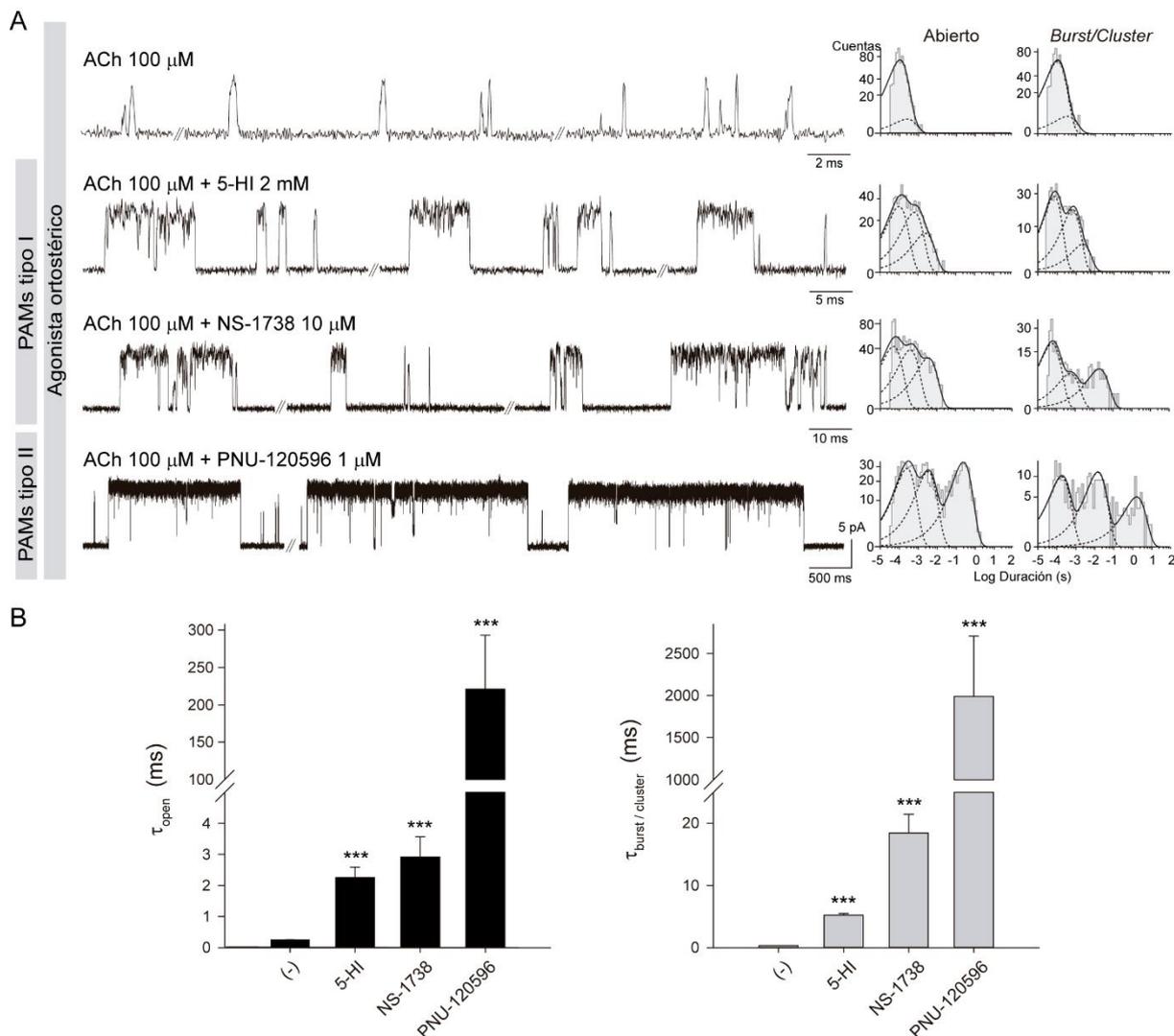


Figura 1.1.6. Modulación alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico por PAMs tipo I y II a nivel de corrientes unitarias. A- Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh $100 \mu\text{M}$ en ausencia y en presencia de los distintos tipos de PAMs. Filtro: 9 kHz , excepto para la condición PNU-120596 filtrada a 3 kHz . Potencial de membrana: -70 mV . A la derecha se observan histogramas de estado abierto y de *bursts/clusters* típicos de cada condición. **B-** Gráficos de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (izquierda, negro) y de *burst/cluster* (derecha, gris). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en ausencia de PAMs.

En resumen, los distintos tipos de PAMs a nivel de corrientes unitarias no modificaron la amplitud del receptor $\alpha 7$, sino que favorecieron su completa resolución, y además prolongaron la duración de las aperturas y de los episodios de activación sostenidos. Pese a que el 5-HI y el NS-1738 no produjeron cambios cinéticos perceptibles a nivel de corrientes macroscópicas, sí lo hicieron a nivel de corrientes microscópicas al inducir la activación de $\alpha 7$ en *bursts*. Por su parte, el PNU-120596 provocó cambios cinéticos notorios tanto a nivel de corrientes macroscópicas como microscópicas,

induciendo episodios de activación de muy larga duración o *clusters*. Considerando el grado de potenciación en términos de duraciones de aperturas y episodios de activación sostenidos como respuesta o actividad intrínseca, el rango de eficacia de los PAMs evaluados fue: PNU-120596 > NS-1738 > 5-HI, el cual coincide con el rango de potencia establecido en base a sus valores de CE_{50} .

Agonista	PAM	τ_{open} (ms)	$\tau_{burst/cluster}$ (ms)	n	N
ACh 100 μ M	-	0,27 \pm 0,01	0,35 \pm 0,02	6	5
4BP-TQS 10 μ M	-	71,71 \pm 37,62***	1396 \pm 539***	4	3
ACh 100 μ M	5-HI 2 mM	2,26 \pm 0,33***	5,20 \pm 0,28***	4	3
ACh 100 μ M	NS-1738 10 μ M	2,85 \pm 0,64***	17,53 \pm 2,52***	7	3
ACh 100 μ M	PNU-120596 1 μ M	221 \pm 72***	1988 \pm 718***	8	4

Tabla I.I.2. Activación y modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts/clusters* en presencia de agonistas y PAMs. Los datos se presentan como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control.

2.2. Influencia de la temperatura en la modulación alostérica positiva

La mayoría de los estudios electrofisiológicos de caracterización de PAMs han sido realizados a temperatura ambiente, pese a que por su potencial uso terapéutico resulte más propicia la evaluación de la potenciación a temperaturas fisiológicas. A nivel de corrientes macroscópicas y ante el incremento de la temperatura se observa una disminución en el efecto potenciador de los PAMs, aunque el mismo continúa siendo significativo (Sitzia *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2012). Las bases moleculares subyacentes a dicho cambio se desconocen, por lo cual se decidió explorarlas a nivel de canal único utilizando los prototipos de PAMs tipo I y II. Para ello se registraron las **corrientes unitarias** del receptor $\alpha 7$ activado por ACh 100 μ M y en presencia de 5-HI 2 mM o PNU-120596 1 μ M a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) y a temperaturas cercanas a la temperatura fisiológica (34 ± 3 °C) (Figura I.I.7). Los registros fueron llevados a cabo sobre células BOSC23 por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* a -70 mV de potencial de membrana.

En el caso del **5-HI**, a 34 °C se observaron aperturas prolongadas y *bursts* al igual que a temperatura ambiente, aunque con menor frecuencia (Figura I.I.7A). Al ajustar los histogramas de estado abierto y de *bursts* a 34 °C con el mínimo de componentes exponenciales (dos y tres respectivamente), se observó una disminución significativa en las duraciones de las aperturas ($p < 0,01$) y de los episodios de activación en *bursts* ($p < 0,05$) ($\tau_{open} = 0,76 \pm 0,16$ ms y $\tau_{burst} = 1,75 \pm 0,48$ ms, $n = 4$, $N = 3$) con respecto a las duraciones a 22 °C ($\tau_{open} = 1,81 \pm 0,45$ ms y $\tau_{burst} = 3,41 \pm 1,00$ ms, $n = 5$, $N = 3$). Sin embargo, la inspección visual de los registros a 34 °C evidenciaba la presencia de eventos potenciados con duraciones similares a las de los registros a temperatura ambiente, sugiriendo que la disminución significativa detectada en las constantes de tiempo podía ser artefactual, dada por la menor frecuencia de aparición de dichos eventos potenciados a lo largo de los registros.

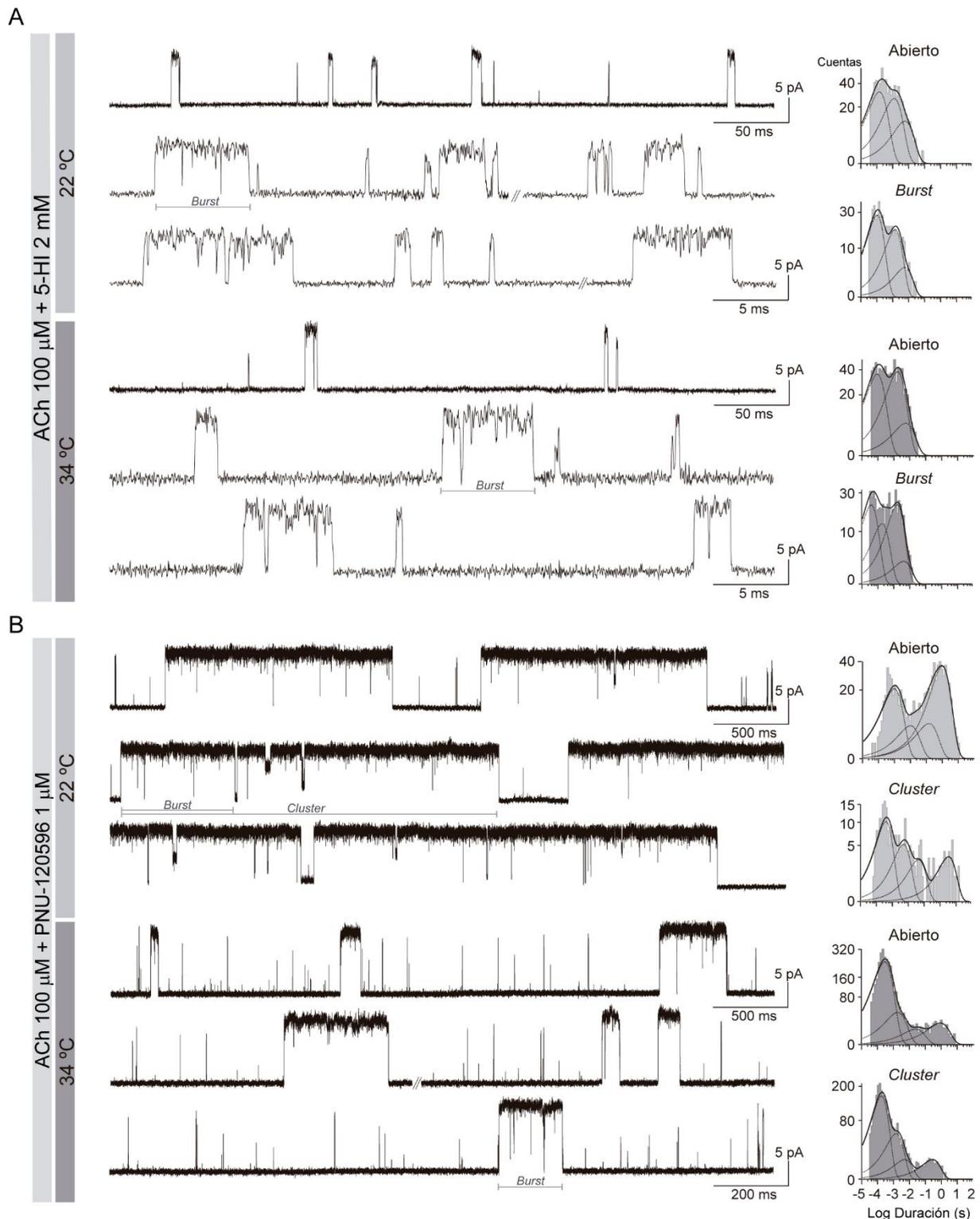


Figura I.I.7. Efecto de la temperatura en la modulación alostérica del receptor $\alpha 7$ por PAMs tipo I y II a nivel de corrientes unitarias. Registros representativos a 22 °C y 34 °C de las corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia y en presencia de distintos prototipos de PAM: **A**- 5-HI, Filtro: 9 kHz y **B**- PNU-120596, Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts/clusters* para cada condición.

Para descartar esa posibilidad y determinar con precisión la duración de los eventos de activación potenciados a temperaturas más elevadas, se realizó el ajuste de los histogramas de estado

abierto y de *bursts* con un componente exponencial adicional, es decir, con tres y cuatro componentes respectivamente. Con el objetivo de estandarizar el análisis, el mismo procedimiento se aplicó para los histogramas de los registros a temperatura ambiente, ajustándolos con cuatro componentes. De este modo, las comparaciones de las duraciones entre ambas temperaturas se realizaron nuevamente considerando las constantes de tiempo obtenidas mediante el ajuste con el componente adicional en ambos casos. Las duraciones promedio de las aperturas y de los *bursts* potenciados por el 5-HI no exhibieron diferencias significativas ($p > 0,05$ en los dos casos) al aumentar la temperatura a 34 °C ($\tau_{open} = 1,91 \pm 0,24$ ms y $\tau_{burst} = 4,12 \pm 0,06$ ms, $n = 4$, $N = 3$) con respecto a la temperatura ambiente ($\tau_{open} = 2,44 \pm 1,05$ ms y $\tau_{burst} = 4,06 \pm 1,26$ ms, $n = 4$, $N = 3$, Figura I.I.8A). Además, el área relativa del componente de *burst* a 20 °C ($0,05 \pm 0,02$) disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a 34 °C ($0,02 \pm 0,01$), en concordancia con la baja frecuencia o proporción de eventos potenciados a temperaturas más elevadas. Por su parte, la adición de un componente exponencial al ajuste de los histogramas de los registros a 22 °C no puso en evidencia eventos con duraciones mayores al promedio, ya que las constantes de tiempo de las aperturas de mayor duración y de los *bursts* no exhibieron diferencias significativas ($p > 0,05$) tras ser obtenidas por los dos tipos de ajuste a esa temperatura. En cambio, en los registros a 34 °C, las constantes de tiempo de las aperturas y de los *bursts* obtenidas al ajustar con el mínimo de componentes o con uno adicional fueron significativamente diferentes, ya que en este último caso se evidenciaron los eventos de activación potenciados que se encontraban en baja proporción o frecuencia. Por lo tanto, en el ajuste con el mínimo de componentes, el pequeño porcentaje de eventos potenciados queda eclipsado, obteniéndose un valor promedio similar al del componente anterior más breve y mayoritario, lo que conduce a errores interpretativos pues parece que las duraciones disminuyen. Sin embargo, se demostró que las duraciones de las aperturas y de los *bursts* inducidos por el PAM tipo I 5-HI permanecieron sin cambios a temperaturas más elevadas, disminuyendo únicamente la frecuencia o proporción de los eventos potenciados, lo que explicaría la disminución de la potenciación reportada a nivel macroscópico.

En contraste, los registros de corrientes unitarias en presencia del **PNU-120596** a 34 °C exhibieron potenciación a través de aperturas prolongadas y *bursts*, aunque llamativamente estos no se agruparon o fusionaron formando los *clusters* o episodios de activación de muy larga duración característicos de este PAM tipo II a temperatura ambiente (Figura I.I.7B). Si bien la duración de las aperturas más prolongadas disminuyó en ~ 2 veces ($p < 0,05$) a 34 °C ($\tau_{open} = 123 \pm 37$ ms, $n = 5$, $N = 3$) con respecto a 22 °C ($\tau_{open} = 207 \pm 79$ ms, $n = 9$, $N = 5$, Figura I.I.8A), el cambio más notorio fue a nivel de los episodios de activación, dada la completa ausencia de los *clusters* a temperaturas más elevadas. A 22 °C el valor del $\tau_{critico}$ entre el tercer y cuarto componentes del histograma de estado cerrado fue relativamente constante (~ 60 -100 ms), ya que períodos de cierre mayores a este tiempo separan entre

sí los *clusters* (cierres inter-*clusters*). Con ese $\tau_{\text{crítico}}$ se generó el histograma de *clusters* y se determinó el τ_{cluster} de 2495 ± 1349 ms a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($n = 9, N = 5$). Como se mencionó previamente, los *clusters* están formados por la agrupación de varios *bursts*, pudiendo establecerse tiempos de cierre muy breves intra-*bursts*, que separan entre sí las aperturas rápidas y sucesivas dentro de un mismo *burst*, y tiempos inter-*bursts* un poco mayores, que aún son intra-*cluster* pues separan entre sí los *bursts* de un mismo *cluster*. Para determinar específicamente la duración de los *bursts* dentro de los *clusters* inducidos por el PNU-120596 a temperatura ambiente se utilizó un $\tau_{\text{crítico}}$ de 0,2 ms (intersección entre los componentes más breves –uno y dos– del histograma de estado cerrado), definiendo como *bursts* a aquellas agrupaciones de aperturas separadas entre sí por tiempos de cierre inferiores a dicho valor. Por lo tanto, la duración de los cierres inter-*bursts* fue superior a 0,2 ms, pero inferior al $\tau_{\text{crítico}}$ de *cluster* de ~60-100 ms, quedando definidos episodios de activación en *bursts* con un τ_{burst} de 258 ± 119 ms ($n = 9, N = 5$), los cuales se agruparon formando *clusters* de muy larga duración (~2-3 s). Por el contrario, a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ el $\tau_{\text{crítico}}$ obtenido por la intersección entre el tercer y cuarto componentes del histograma de estado cerrado resultó ser menor (~2-5 ms), más variable, y en coincidencia con lo observado visualmente en el registro de corrientes unitarias, los episodios de activación fueron de una duración media considerablemente menor a la de los *clusters*, pareciendo consistir únicamente en *bursts* aislados. Con ese $\tau_{\text{crítico}}$ de ~2-5 ms se construyó un histograma de *bursts*, donde el componente más prolongado exhibió una duración media de 206 ± 78 ms ($n = 5, N = 3$, Figura I.I.8A), significativamente inferior a la duración de los *clusters* observados a temperatura ambiente ($p < 0,001$). Para verificar que dichos episodios de activación a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ eran efectivamente *bursts*, y no *clusters* de menor duración que los inducidos a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, se construyó el histograma de *bursts* a esta temperatura con un $\tau_{\text{crítico}}$ de 0,2 ms, estableciendo los cierres intra-*bursts* como inferiores a dicha duración. Se obtuvo entonces un τ_{burst} de 164 ± 43 ms, sin diferencias significativas con la duración de los *bursts* obtenidos con el $\tau_{\text{crítico}}$ de 2-5 ms ($p > 0,05, n = 5, N = 3$). Esto confirmó la desaparición de los *clusters* a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde los episodios de activación sostenidos resultaron ser únicamente *bursts* incapaces de agruparse en *clusters* de muy larga duración. Además, dado que no se observaron diferencias significativas entre la duración de las aperturas más prolongadas y de los *bursts* a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p > 0,05$), se infirió que dichos *bursts* estaban compuestos mayoritariamente por aperturas breves.

A diferencia del 5-HI a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde los episodios de activación visibles en el registro eran artefactualmente reducidos en duración al construir los histogramas ajustados con el mínimo de componentes exponenciales, en el caso del PNU-120596, la ausencia de *clusters* no sólo fue directamente observable, sino que también fue determinada a través de los histogramas. Sin embargo, para descartar una posible conclusión errónea y proceder de igual manera en el análisis para ambos tipos de PAMs, se realizó el ajuste de los histogramas de estado abierto y de *bursts/clusters* para el

PNU-120596 a ambas temperaturas con un componente adicional (cinco componentes) y se comparó con los resultados obtenidos con el mínimo de componentes de ajuste (cuatro componentes). El componente adicional de apertura no exhibió diferencias en su duración ($p > 0,05$, $n = 9$, $N = 5$) con respecto al componente más prolongado determinado con el mínimo de componentes en las distintas temperaturas (299 ± 202 ms a 22 °C y 183 ± 76 ms a 34 °C). Tampoco se observaron diferencias al ajustar con un componente adicional la duración de los *clusters* a 22 °C (2730 ± 1401 ms) y de *bursts* a 34 °C (246 ± 121 ms) con respecto a las duraciones ajustadas con el mínimo de componentes. Por lo tanto, en el caso del PNU-120596 no existieron diferencias entre ajustar con el mínimo de componentes o con uno adicional, ya que la disminución de la duración de las aperturas y la desaparición de los *clusters* se evidenció en ambos casos. A su vez, esto permitió verificar que el ajuste con un componente adicional para el 5-HI no generó un resultado artefactual, sino que puso en evidencia un componente de mayor duración real o existente, que de otro modo se encontraba eclipsado por su baja proporción o frecuencia en los registros.

Respecto a la **amplitud** de $\alpha 7$, como se demostró previamente, los distintos tipos de PAMs posibilitaron de igual manera su completa resolución sin modificarla, por lo cual, fue posible analizarla independientemente del tipo de PAM. Mientras que a 22 °C la amplitud fue de ~ 10 pA ($9,97 \pm 0,64$ pA, $n = 3$, $N = 3$), al incrementar la temperatura a 34 °C se observó un aumento a $11,94 \pm 1,02$ pA ($n = 3$, $N = 3$) (Figura I.I.8B). Con el objetivo de verificar si el cambio detectado en la conductancia unitaria del canal se debió efectivamente al incremento de la temperatura y a través de qué mecanismo molecular, se determinó el coeficiente de temperatura Q_{10} . Este es una medida de la tasa de variación de un dado parámetro de un sistema químico o biológico como consecuencia de un incremento de 10 °C en la temperatura. El coeficiente Q_{10} es un valor sin unidades que se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$Q_{10} = \left(\frac{A_2}{A_1} \right)^{10/(T_2 - T_1)}$$

donde A_1 y A_2 se corresponden con el valor promedio de la amplitud del canal a las temperaturas T_1 y T_2 respectivamente, estas últimas expresadas en grados Celsius o Kelvin. Por lo tanto, mientras que un valor de Q_{10} de $1,0$ se corresponde con un parámetro independiente de la temperatura, un valor de $Q_{10} > 1,0$ indica dependencia térmica a distintos niveles. Los valores de $Q_{10} \sim 1,0$ se corresponden con un aumento en la difusión de las moléculas y iones en solución, los valores de $Q_{10} \sim 2,0$ son típicos de reacciones químicas convencionales, y los valores de $Q_{10} > 2,0$ implican cambios conformacionales a gran escala, comunes en las proteínas. En este caso, el valor de Q_{10} obtenido para la variación de la amplitud de $\alpha 7$ con la temperatura fue de $1,2$. Esto implica que el incremento de la amplitud a mayor temperatura se debió únicamente a un aumento en la velocidad de difusión de los iones en solución ($Q_{10} \sim 1,0$) y no a cambios conformacionales en el receptor proteico.

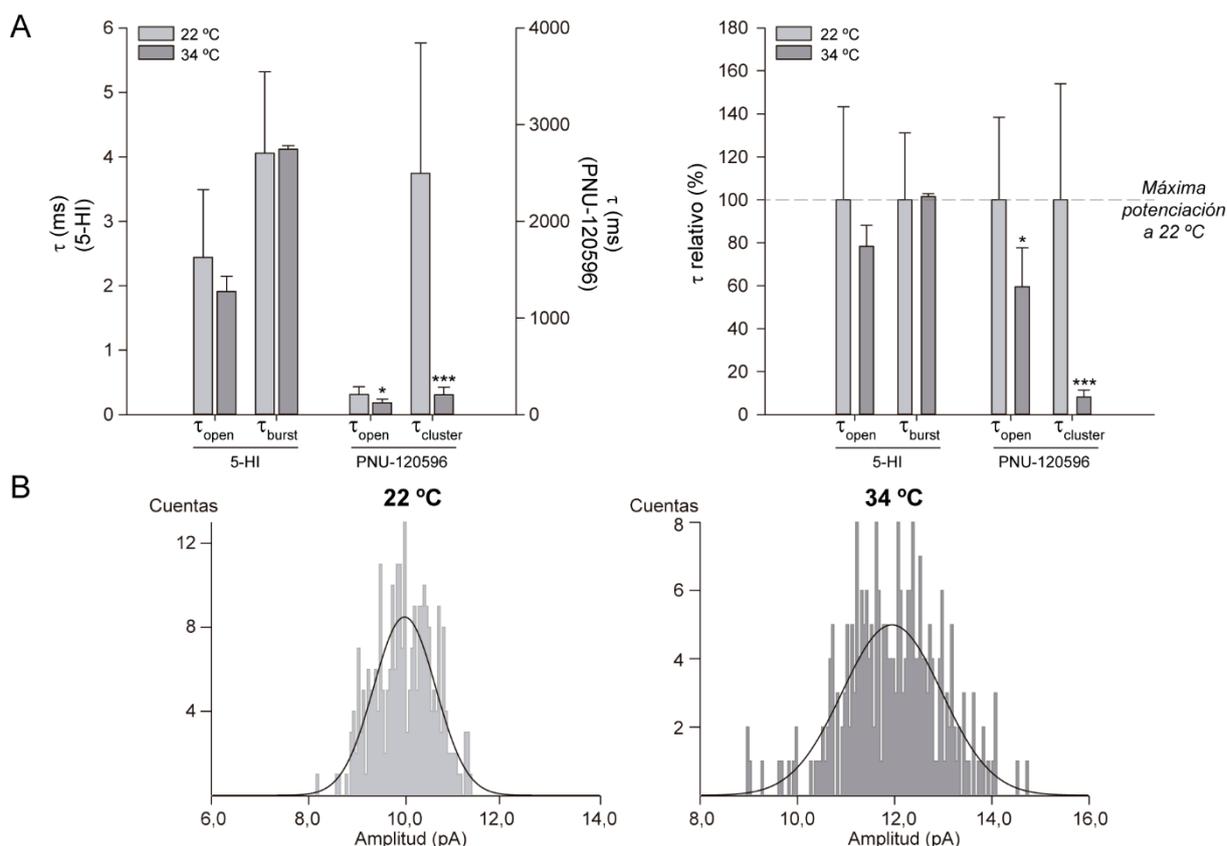


Figura I.1.8. Efecto de la temperatura en la modulación por PAMs tipo I y II a nivel cinético y de conductancia unitaria. A- Gráficos de barras de las constantes de tiempo de estado abierto y de *burst*/*cluster* de $\alpha 7$ a 22 °C y 34 °C expresadas de forma absoluta (izquierda) o relativa como porcentaje del control a temperatura ambiente (derecha). B- Histogramas representativos de amplitud de $\alpha 7$ a 22 °C y 34 °C.

En resumen, a nivel de corrientes unitarias se observó una **sensibilidad diferencial a la temperatura por parte de los PAMs tipo I y II**, basada en mecanismos moleculares distintivos que provocan el mismo efecto macroscópico de disminución de la potenciación. El origen microscópico de esta reducción radica en los cambios cinéticos diferenciales en presencia de ambos tipos de PAMs, ya que, por el contrario, la amplitud del canal aumenta levemente (Figura I.1.8A-B). La modulación alostérica por el **PAM tipo I (5-HI)** resultó **menos sensible a la temperatura**, ya que las aperturas y *bursts* potenciados a 34 °C permanecieron sin cambios en sus duraciones con respecto a los registrados a 22 °C, aunque disminuyeron en frecuencia explicando el menor grado de potenciación a nivel macroscópico. En contraste, la potenciación por el **PAM tipo II (PNU-120596)** resultó notoriamente **más sensible a la temperatura**, ya que disminuyeron en duración las aperturas y desaparecieron los episodios de activación en *clusters* detectándose únicamente *bursts* aislados, lo cual explica la reducción de la potenciación observada en las corrientes macroscópicas. La conservación en la duración de los *bursts* inducidos por el PAM tipo I y la completa ausencia de los *clusters* inducidos por el PAM tipo II a temperaturas más elevadas sugirió que la duración de los episodios de activación sostenidos es el parámetro cinético con mayor dependencia a la temperatura.

2.3. Determinantes estructurales de la modulación alostérica positiva

Se han identificado residuos del receptor $\alpha 7$ a nivel del ECD, de la interfaz ECD-TMD y del TMD que constituyen determinantes estructurales de la potenciación (Introducción, págs. 34-35). Estos permiten aproximar los sitios alostéricos de unión, aunque no proporcionan una evidencia inequívoca acerca de su localización. En particular, la influencia del TMD ha sido descrita en profundidad para los PAMs tipo II empleando el **receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A** (Grønlien *et al.*, 2007; Bertrand *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; Collins y Millar, 2010; Andersen *et al.*, 2016) y el **receptor $\alpha 7$ TSLMF** (DaCosta *et al.*, 2011). Sin embargo, existen controversias respecto al posible impacto de los determinantes estructurales del TMD en la potenciación ejercida por los PAMs tipo I. Si bien se ha reportado que el 5-HI y el NS-1738 potencian la quimera $\alpha 7$ -5HT₃A, no existen estudios sobre su efecto en el receptor quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF. Por ello, en esta sección se examina la influencia de esos cinco determinantes estructurales transmembrana (S223T, A226S, M254L, I281M y V288F) sobre la potenciación ejercida por el 5-HI y el NS-1738 a nivel de canal único. Para ello se realizaron registros de corrientes unitarias del receptor $\alpha 7$ TSLMF activado por ACh 100 μ M en presencia de 5-HI 2 mM, NS-1738 10 μ M y PNU-120596 1 μ M, por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* a -70 mV de potencial de membrana.

Inicialmente se caracterizó la activación con ACh 100 μ M del receptor $\alpha 7$ TSLMF, el cual presentó una cinética ligeramente más lenta que el receptor $\alpha 7$ WT, con duraciones medias de aperturas y *bursts* de ~1-2 ms, en concordancia con reportes previos (DaCosta *et al.*, 2011; Andersen *et al.*, 2013) (Tabla I.I.3, Figura I.I.9A). El $\tau_{\text{crítico}}$ (~1-4 ms) para definir los *bursts* fue obtenido a partir de la intersección de los componentes dos y tres del histograma de estado cerrado. Los histogramas de estado abierto y de *bursts* fueron ajustados con tres componentes exponenciales cada uno.

Agonista	PAM	τ_{open} (ms)	$\tau_{\text{burst/cluster}}$ (ms)	n	N
ACh 100 μ M	-	1,26 \pm 0,43	1,97 \pm 0,73	5	4
ACh 100 μ M	5-HI 2 mM	5,38 \pm 1,04***	18,55 \pm 8,69**	3	3
ACh 100 μ M	NS-1738 10 μ M	0,88 \pm 0,46	4,89 \pm 1,47**	7	3
ACh 100 μ M	PNU-120596 1 μ M	9,71 \pm 1,90***	44,03 \pm 25,15***	4	3

Tabla I.I.3. Activación y modulación alostérica positiva de $\alpha 7$ TSLMF a nivel de corrientes unitarias. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts/clusters* en presencia de ACh y PAMs. Los datos se presentan como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en ausencia de PAMs.

Por un lado, al evaluar la potenciación por los dos PAMs tipo I sobre el receptor quíntuple mutante se observó que el **5-HI** potenció significativamente las aperturas ($p < 0,001$) y los *bursts* ($p < 0,01$), mientras que el **NS-1738** no modificó el tiempo de estado abierto, pero sí incrementó la duración de los *bursts* ($p < 0,01$) (Tabla I.I.3, Figura I.I.9A-B). Para ambos moduladores, los histogramas de estado abierto y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales. Estos últimos

histogramas fueron construidos con $\tau_{\text{críticos}}$ de ~ 2 -5 ms y de ~ 5 -10 ms obtenidos a partir de la intersección entre los componentes segundo y tercero, y tercero y cuarto de los histogramas de estado cerrado para el 5-HI y el NS-1738 respectivamente. Por otro lado, pese a que el receptor $\alpha 7$ TSLMF fue reportado como insensible al **PNU-120596** (DaCosta *et al.*, 2011), este PAM tipo II potenció significativamente las aperturas ($p < 0,001$) y los *bursts* ($p < 0,001$), siendo estos últimos bastante infrecuentes. De todos modos, a diferencia del efecto modulador ejercido en $\alpha 7$ WT, se observó una completa ausencia de los *clusters* de muy larga duración en el receptor quántuple mutante, lo cual se correlaciona con los reportes acerca de la insensibilidad a este modulador (DaCosta *et al.*, 2011) (Tabla I.I.3, Figura I.I.9A-B). Los histogramas de estado abierto y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales, y el $\tau_{\text{crítico}}$ utilizado fue de ~ 2 -5 ms, obtenido a partir de la intersección entre los componentes segundo y tercero del histograma de estado cerrado.

Con el objetivo de comparar la potenciación de cada PAM en el receptor quántuple mutante con respecto al receptor $\alpha 7$ WT, se calculó la relación entre el grado de potenciación ejercido por cada PAM en cada receptor, y se expresó como potenciación relativa al efecto potenciador en $\alpha 7$ WT (Figura I.I.9D). Previamente, para obtener los grados de potenciación de los distintos PAMs se normalizaron las duraciones de las de las aperturas y de los *bursts* potenciados con respecto a su control en ausencia de PAM para cada receptor. Considerando una potenciación máxima del 100 % para cada PAM en el receptor $\alpha 7$ WT, todos los PAMs exhibieron una disminución en el grado de potenciación en el receptor $\alpha 7$ TSLMF. A nivel de las aperturas, el **5-HI** mantuvo un $51,82 \pm 9,95$ % del grado de potenciación máximo ($n = 3$, $N = 3$, $p < 0,01$), mientras que el **NS-1738** sólo conservó un $6,64 \pm 3,46$ % ($n = 7$, $N = 3$, $p < 0,0001$). El **PNU-120596** experimentó la mayor pérdida de su grado de potenciación máximo en las aperturas, ya que fue de solamente $0,96 \pm 0,19$ % en el receptor quántuple mutante ($n = 4$, $N = 3$, $p < 0,001$). A nivel de los episodios de activación sostenidos o *bursts*, el 5-HI mantuvo un $63,42 \pm 29,68$ % ($n = 3$, $N = 3$, $p < 0,05$) de su grado de potenciación, mientras que para el NS-1738 fue sólo del $4,95 \pm 1,48$ % ($n = 7$, $N = 3$, $p < 0,001$). Nuevamente la máxima pérdida del grado de potenciación se observó en el caso del PNU-120596, con un $0,39 \pm 0,22$ % ($n = 4$, $N = 3$, $p < 0,001$).

En resumen, se verificó la importancia de los cinco residuos de la cavidad transmembrana del receptor $\alpha 7$ WT para la efectiva potenciación por parte del PAM tipo II PNU-120596, el cual presuntamente se une en este sitio. Al comparar las duraciones de aperturas y *bursts* del receptor quántuple mutante en presencia del modulador con respecto al control en su ausencia se observó potenciación significativa, pero al relativizarlo y compararlo con el grado de potenciación ejercido en $\alpha 7$ WT, el efecto fue prácticamente nulo. Esto permitió revalidar el concepto acerca de la insensibilidad del receptor $\alpha 7$ TSLMF a los PAMs tipo II como PNU-120596, lo cual además se encuentra en concordancia con la incapacidad de dicho compuesto para potenciar al receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A}.

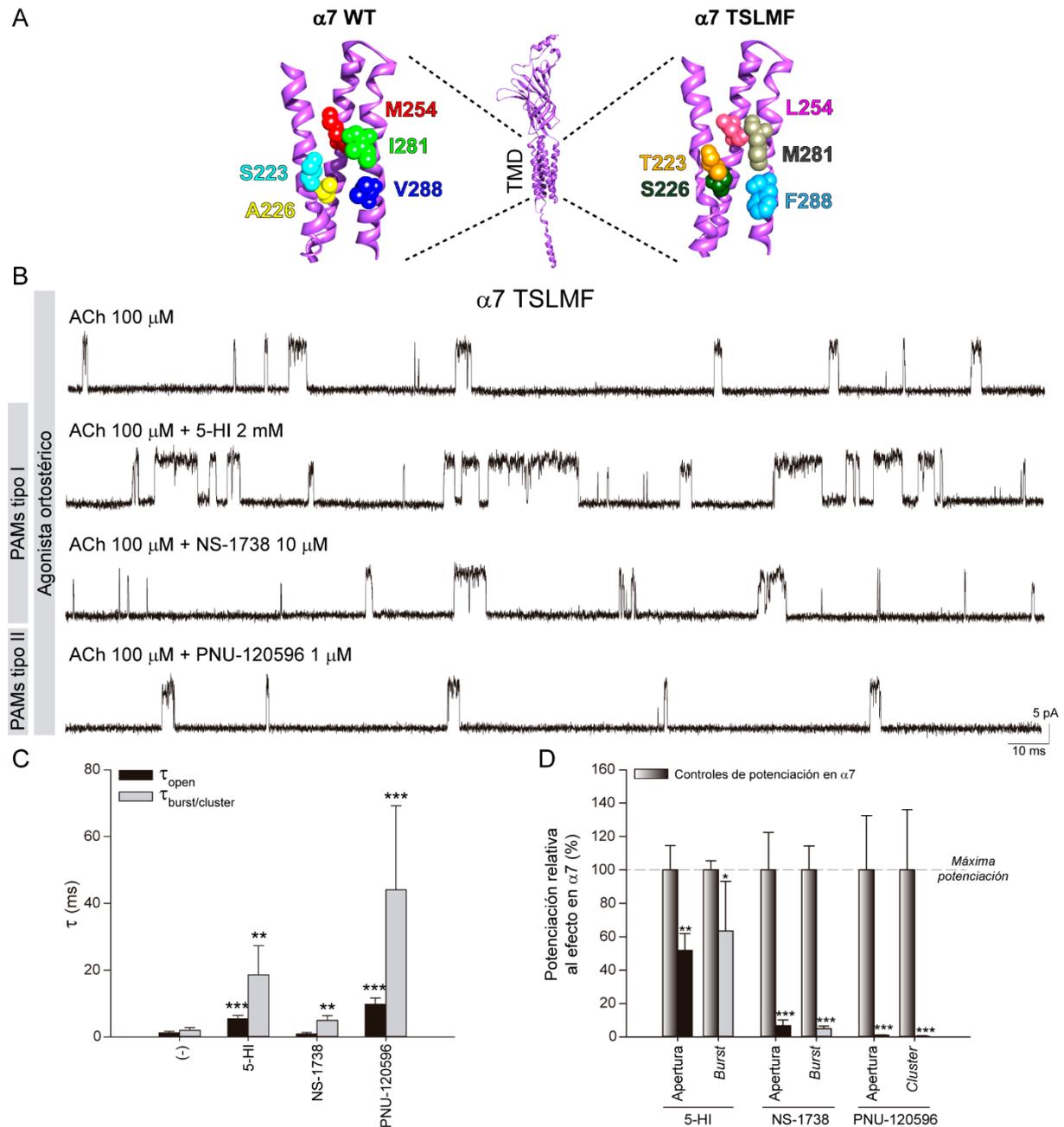


Figura I.I.9. Efecto de los PAMs tipo I y II en el receptor $\alpha 7$ TSLMF. **A-** Vista de las hélices M1, M2 y M3 con los cinco determinantes de la potenciación por el PNU-120596 en $\alpha 7$ WT y sus respectivas mutaciones en $\alpha 7$ TSLMF. **B-** Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ TSLMF activado por ACh 100 μ M en ausencia y en presencia de los distintos tipos de PAMs. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. **C-** Gráfico de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (negro) y de *burst* (gris) de $\alpha 7$ TSLMF potenciado por los distintos tipos de PAMs. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. **D-** Gráfico de barras de la potenciación en $\alpha 7$ TSLMF relativa al efecto del PAM en $\alpha 7$ WT. Las barras con degradado indican la máxima potenciación en aperturas y *bursts* para cada PAM en $\alpha 7$ WT. Las barras en negro y en gris indican el grado de potenciación de $\alpha 7$ TSLMF relativo a $\alpha 7$ WT a nivel de aperturas y de *bursts* respectivamente. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la respectiva condición control.

Llamativamente, para los dos PAMs tipo I evaluados también se observó una disminución en el grado de potenciación del receptor $\alpha 7$ TSLMF relativo al efecto ejercido sobre el receptor salvaje. Sin

embargo, hubo una diferencia notoria entre ellos. El 5-HI potenció significativamente al receptor quíntuple mutante, prolongando la duración de sus aperturas y *bursts*, aunque en un 50-60 % de lo que las prolongó en $\alpha 7$ WT. En cambio, el NS-1738 no potenció las aperturas del receptor $\alpha 7$ TSLMF, pero sí levemente los *bursts*, sólo en un 5 % con respecto a su grado de potenciación en el receptor salvaje. Es así que los cinco **residuos transmembrana** del receptor $\alpha 7$ que resultan **determinantes estructurales de la potenciación** por PNU-120596, también afectaron la potenciación ejercida por los **PAMs tipo I**, particularmente la del NS-1738, cuya actividad disminuyó notoriamente. Por el contrario, el 5-HI pudo conservar por lo menos la mitad de su máximo grado de potenciación en el receptor mutante, siendo el PAM más resistente a la influencia de los determinantes transmembrana.

Discusión

La disfunción de la señalización colinérgica mediada por el receptor $\alpha 7$ homomérico se encuentra presente en numerosos desórdenes neurológicos, psiquiátricos, inflamatorios y/o neurodegenerativos (Thomsen *et al.*, 2010; Dineley *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Bouzat *et al.*, 2018). Tanto es así que el receptor $\alpha 7$ constituye un blanco farmacológico prometedor, con enfoques o estrategias terapéuticas que apuntan a incrementar su funcionalidad promoviendo la activación y/o modulación alostérica positiva mediante agonistas y PAMs respectivamente. El desarrollo de estos fármacos selectivos con potencialidad clínica requiere de la dilucidación de los mecanismos de acción de dichos compuestos a nivel molecular, no sólo para contribuir en el diseño y optimización de nuevos ligandos, sino también para la comprensión de sus efectos a nivel celular y dentro del contexto fisiológico y/o fisiopatológico. Por estas razones, se exploraron los **mecanismos de activación y modulación alostérica del receptor homomérico $\alpha 7$** , correlacionando los efectos a nivel macroscópico con el accionar a nivel molecular, desde la perspectiva de las corrientes unitarias.

Respecto de la **activación ortostérica**, el mecanismo de acción de los agonistas ortostéricos como la ACh sobre el receptor $\alpha 7$ ha sido ampliamente estudiado, principalmente por sus características únicas que lo diferencian de otros subtipos de nAChRs (Bouzat *et al.*, 2008, 2018; Andersen *et al.*, 2013). En los resultados expuestos en la presente parte del capítulo I se observó que la rápida activación y desensibilización de las corrientes macroscópicas evocadas por la ACh se correlacionaron con el perfil de las corrientes unitarias, dado en su mayoría por aperturas breves y aisladas, que infrecuentemente se agruparon de manera sucesiva originando episodios de activación en *bursts*, también muy breves y de duración similar a la de las aperturas. Dada la brevedad de los eventos de activación, la resolución de la amplitud máxima de las corrientes a nivel de canal único no fue óptima, habiéndose observado un amplio espectro de amplitudes de entre las cuales ~ 10 pA se correspondió con los eventos completamente resueltos o de mayor duración. Si bien en el sistema experimental empleado las constantes de decaimiento rápido y lento de las corrientes macroscópicas fueron del orden de $\sim 30-50$ ms y de $\sim 500-1000$ ms respectivamente, se ha reportado que la velocidad de desensibilización sería del orden inferior al milisegundo, similar a las duraciones de los episodios de activación (Bouzat *et al.*, 2008). Por esta razón, se propone a la desensibilización como el principal proceso por el cual los canales cesan su activación, al menos a nivel ionotrópico, ya que a nivel metabotrópico la señalización puede continuar pese a encontrarse el canal en estado desensibilizado (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Egea *et al.*, 2015; Kabbani y Nichols, 2018). Debido a la alta permeabilidad de $\alpha 7$ al Ca^{+2} , es probable que la rápida velocidad de desensibilización constituya un mecanismo de defensa o de filtración propio del receptor contra la estimulación excesiva, previniendo así la citotoxicidad, pero garantizando a su vez que el aumento transitorio de dichos iones se

transforme en un evento sostenido de señalización metabotrópica por distintas vías intracelulares. A estas peculiaridades del receptor $\alpha 7$ se añaden un perfil cinético de corrientes unitarias independiente de la concentración de agonista y una máxima activación del receptor con una única molécula de agonista unida (Bouzat *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2013). Esto torna al receptor $\alpha 7$ óptimo para mediar la señalización colinérgica principalmente por transmisión extrasináptica, lo cual se encuentra en concordancia con su estequiometría homomérica de origen evolutivo más ancestral, donde la transmisión sináptica especializada aún no era primordial para la comunicación intercelular; y con su ubicua localización tanto en células neuronales como no neuronales.

Promover la activación ortostérica de $\alpha 7$ fue la primera estrategia terapéutica desarrollada, habiéndose generado diversos agonistas parciales cuya menor eficacia brinda un mayor margen de seguridad para el uso clínico. Sin embargo, los tratamientos prolongados con agonistas ortostéricos alteran los patrones de secreción del agonista endógeno e inducen la desensibilización e internalización de los receptores, provocando tolerancia y/o dependencia. Además, la selectividad de los agonistas ortostéricos es más limitada, dado el alto grado de conservación del sitio ortostérico entre los nAChRs, lo que conlleva la aparición de efectos secundarios (Papke, 2014; Foucault-Fruchard y Antier, 2017; Yang *et al.*, 2017; Manetti *et al.*, 2018). Por estas razones, el foco de interés se extendió al desarrollo de ligandos alostéricos capaces de unirse a sitios distintos del ortostérico y menos conservados entre los nAChRs, brindando una mayor selectividad y menor proporción de efectos adversos.

La **activación alostérica** del receptor $\alpha 7$ surgió como una posible estrategia terapéutica a partir del descubrimiento de agonistas alostéricos como el 4BP-TQS (Gill *et al.*, 2011). El mecanismo molecular de la activación alostérica contrasta notablemente con el de la clásica activación ortostérica. Las corrientes macroscópicas exhiben una cinética más lenta, tanto a nivel de la activación como de la desensibilización, la cual virtualmente se anula por estar muy disminuida su velocidad. En los resultados aquí expuestos a nivel de las corrientes unitarias se observó que la duración de las aperturas individuales se prolongó notoriamente y que se indujo la aparición de eventos de activación sostenidos en *clusters* compuestos por varios *bursts*, con duraciones superiores al segundo. Estos marcados cambios cinéticos se correlacionan con la disminución en la velocidad de desensibilización, lo que permite al receptor permanecer más tiempo en el estado conformacional abierto. La conductancia unitaria no se vio afectada por el 4BP-TQS, el cual únicamente prolongó las duraciones posibilitando una correcta resolución de la máxima amplitud de ~ 10 pA. Contrariamente, un único reporte previo ha señalado un leve aumento de la conductancia unitaria en los canales de $\alpha 7$ activados alostéricamente por el 4BP-TQS (~ 100 pS) con respecto a los activados ortostéricamente por la ACh (~ 90 pS), considerando también el componente de mayor amplitud y sugiriendo que ambos modos de

activación estabilizan un estado conformacional abierto diferente (Pałczynska *et al.*, 2012). Sin embargo, esta sutil diferencia de conductancia reportada podría deberse a las variaciones en el sistema experimental empleado, ya que la mayoría de los estudios realizados con ligandos alostéricos sobre receptores no evidenciaron una modificación significativa de la máxima amplitud del receptor (Williams *et al.*, 2011a; Andersen *et al.*, 2013, 2016; Lasala *et al.*, 2018).

Se sabe que los agonistas alostéricos en presencia de un agonista ortostérico funcionan como PAMs, generalmente tipo II, y por eso se los denomina también ago-PAMs. Se ha descrito su unión a la cavidad transmembrana que presuntamente constituye el sitio alostérico de unión de los PAMs tipo II (Gill *et al.*, 2011; Papke *et al.*, 2014). En particular, el residuo M254 es un determinante estructural de su actividad, dado que el 4BP-TQS no puede activar alostéricamente al receptor mutante M254L (Gill *et al.*, 2011). Además se ha descrito que el 4BP-TQS requiere de su unión a dos sitios alostéricos diferentes para mediar efectivamente la activación alostérica (Horenstein *et al.*, 2016). Al unirse a la cavidad transmembrana ejerce su accionar como PAM tipo II, produciendo únicamente potenciación sin competencia con el agonista ortostérico. En ausencia del agonista ortostérico, el 4BP-TQS se une simultáneamente al sitio transmembrana y a la cavidad vestibular del ECD, produciendo entonces la activación alostérica. La mutación D101A del sitio vestibular anula el efecto de 4BP-TQS como agonista alostérico, sin afectar su accionar como PAM tipo II (Horenstein *et al.*, 2016). Hasta el momento, el enantiómero activo del 4BP-TQS, denominado GAT 107, ha sido evaluado en modelos animales de dolor agudo y crónico, aunque sólo resultó efectivo en el último caso (Bagdas *et al.*, 2016; Donvito *et al.*, 2017).

Contrastando la **activación alostérica** con respecto a la **activación ortostérica**, como ventajas de la primera se pueden mencionar una mayor selectividad, por su unión a un sitio alostérico menos conservado limitando así los efectos adversos, una mayor potencia y una mayor eficacia sin generar tolerancia al no inducir desensibilización de los receptores. Sin embargo, esta disminución de la desensibilización constituye a su vez la principal desventaja de estos fármacos en su uso terapéutico, pues prácticamente eliminan el mecanismo protector que impide un ingreso desmedido de Ca^{+2} al interior celular, siendo potencialmente citotóxicos. De todos modos continúan siendo una alternativa terapéutica atractiva, principalmente para patologías donde la secreción endógena de ACh está notoriamente disminuida, ya que dosis bajas son efectivas y considerando que la vida media de estos compuestos *in vivo* no resulta muy prolongada, se limitaría considerablemente su citotoxicidad, tornándolos clínicamente más seguros, como se ha observado en los estudios en modelos animales (Bagdas *et al.*, 2016; Donvito *et al.*, 2017).

El otro enfoque terapéutico de gran interés es la **modulación alostérica positiva** del receptor $\alpha 7$ homomérico. Además de presentar las ventajas propias de los ligandos alostéricos como una mayor

selectividad, menor proporción de efectos adversos, y menor tolerancia y/o dependencia; los PAMs permiten mantener el patrón temporal y espacial de secreción del agonista endógeno, ya que al carecer de actividad intrínseca requieren de la presencia de ACh para modular positivamente al receptor (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Williams *et al.*, 2011b; Chatzidaki y Millar, 2015; Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat *et al.*, 2018). Esta característica resulta atractiva desde el punto de vista terapéutico porque la administración de estos fármacos no altera la activación fisiológica del receptor a nivel espaciotemporal, sino que sólo la refuerza o potencia, a diferencia de los tratamientos con agonistas ortostéricos y/o alostéricos que exhiben actividad intrínseca. Se han llevado a cabo numerosos estudios en modelos animales y dos ensayos clínicos en humanos con diversos PAMs del receptor $\alpha 7$, habiéndose registrado efectos pro-cognitivos, antiinflamatorios, antidepresivos y antinociceptivos prometedores (revisados en (Yang *et al.*, 2017; Manetti *et al.*, 2018)).

Los PAMs exhiben una notoria diversidad a nivel estructural, ya que mínimos cambios en la estructura química generan un amplio espectro de compuestos con actividad variable y perfiles farmacológicos muy distintos entre sí. En la presente parte del capítulo I se describieron los mecanismos moleculares de potenciación de dos compuestos prototipo de PAM tipo I, el **5-HI** y el **NS-1738**, y de un compuesto prototipo de PAM tipo II, el **PNU-120596**. La clasificación de los PAMs en tipo I y II se basa en los efectos ampliamente descritos de dichos moduladores sobre las corrientes macroscópicas (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Grønlien *et al.*, 2007; Faghieh *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2011b; Chatzidaki y Millar, 2015), siendo escasos los reportes que han explorado su accionar a nivel de corrientes unitarias. Incluso estos estudios únicamente han caracterizado a los PAMs tipo II PNU-120596 (Hurst *et al.*, 2005; DaCosta *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011a; DaCosta y Sine, 2013) y TQS (Palczynska *et al.*, 2012).

Con respecto al **prototipo de PAM tipo II PNU-120596** (Hurst *et al.*, 2005), los resultados expuestos en el presente capítulo se encontraron en concordancia con los reportes previos, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Las corrientes macroscópicas evocadas por la ACh en presencia del modulador se incrementaron notoriamente en su pico máximo y su carga neta debido a un enlentecimiento profundo de la velocidad de desensibilización, dando una relación carga neta/pico superior a uno, como es esperable de un PAM tipo II. Además, el PNU-120596 fue capaz de recuperar efectivamente a los receptores desensibilizados, induciendo importantes corrientes de reactivación. En línea con dichas observaciones, cambios cinéticos pronunciados fueron detectados a nivel de las corrientes unitarias potenciadas por el PNU-120596, con aperturas muy prolongadas que confluyeron en *bursts*, los cuales a su vez se agruparon en *clusters*, episodios de activación muy sostenidos del orden de los segundos, característicos de este PAM tipo II y similares a los inducidos por el 4BP-TQS. Por eso, al igual que ocurre con los agonistas alostéricos, algunos estudios han sugerido una potencial citotoxicidad de los PAMs tipo II de alta eficacia, dado que virtualmente eliminan la rápida

desensibilización que actúa fisiológicamente impidiendo el influjo excesivo de Ca^{+2} (Ng *et al.*, 2007; Guerra-Álvarez *et al.*, 2015). Igualmente existen controversias al respecto porque la mayoría de los estudios que reportan el efecto citotóxico fueron llevados a cabo *in vitro*, a temperaturas no fisiológicas y con concentraciones de PAM muy elevadas en comparación a las que efectivamente se alcanzarían *in vivo* (Hu *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2012; Uteshev, 2016).

Respecto del mecanismo molecular de acción de los PAMs tipo II, está ampliamente aceptado que los mismos inducen la desestabilización del estado conformacional desensibilizado del receptor, lo cual puede traducirse en una disminución de la velocidad por la cual el estado abierto pasa al estado desensibilizado, y/o en un aumento de la velocidad por la cual el receptor desensibilizado se reactiva pasando nuevamente al estado abierto (Introducción, págs. 32-33, Fig. 14) (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Williams *et al.*, 2011b). Al ser el estado desensibilizado menos estable, el receptor tiende a permanecer más tiempo en el estado abierto, lo cual explica las aperturas prolongadas; y cuando pasa al estado desensibilizado inestable, se recupera con facilidad abriendo nuevamente, lo cual explica la activación en episodios sostenidos como los *clusters*, ya que la misma molécula de receptor sucesivamente abre, desensibiliza y reactiva. Si bien en la fase de decaimiento de la corriente macroscópica en presencia de agonista normalmente predomina la desensibilización, también ocurre en menor medida reactivación de receptores desensibilizados y cerrados. En presencia de los PAMs tipo II se observa un enlentecimiento de la velocidad de decaimiento, que fue inicialmente descrito como una “disminución en la desensibilización”, aunque podría en realidad deberse primariamente a un “aumento en la recuperación-reactivación de la desensibilización”. Incluso se ha propuesto que el PNU-120596 sólo se uniría al receptor en el estado desensibilizado rápido inducido inicialmente por el agonista ortostérico, para luego favorecer su reactivación y su retorno al estado abierto (Szabo *et al.*, 2014). Este modelo se correlaciona con algunos reportes donde en presencia de ACh y PNU-120596 se observa al inicio una corriente evocada por el agonista que desensibiliza en forma completa, y luego un segundo pico de corriente potenciada con los cambios cinéticos en el decaimiento (Szabo *et al.*, 2014).

Con respecto a los **PAM tipo I** se describieron dos compuestos prototipo, el **5-HI** (Zwart *et al.*, 2002) y el **NS-1738**, que exhibe un perfil macroscópico de PAM tipo I pese a su estructura química semejante a la del prototipo de PAM tipo II PNU-120596 (Timmermann *et al.*, 2007). Los efectos a nivel de corrientes macroscópicas para los PAMs tipo I han sido previamente reportados, y los resultados aquí expuestos se mostraron en concordancia, con un incremento del pico de la corriente inducida por la ACh, sin modificaciones o con cambios mínimos en la desensibilización (Grønlien *et al.*, 2007; Bertrand *et al.*, 2008). Al mantener este mecanismo de protección frente al influjo masivo de Ca^{+2} , los PAMs tipo I resultan clínicamente más promisorios, brindando un mayor margen de seguridad con menor riesgo de citotoxicidad (Ng *et al.*, 2007; Bouzat *et al.*, 2018). El aumento observado en la carga

neta fue relativamente proporcional al aumento en el pico máximo, por lo cual la relación carga neta/pico fue ~ 1 , como es esperable para los PAMs tipo I. Pese a la ausencia de cambios cinéticos pronunciados a nivel macroscópico, las corrientes unitarias en presencia de PAMs tipo I exhibieron un perfil cinético diferente al de las corrientes en ausencia de moduladores (Andersen *et al.*, 2016). Tanto el 5-HI como el NS-1738 prolongaron las aperturas e indujeron episodios sostenidos de activación en *bursts*, aunque los cambios cinéticos fueron considerablemente menos pronunciados que los ejercidos por el PAM tipo II PNU-120596. Además, aunque a nivel de corrientes macroscópicas (considerando como respuesta el pico de corriente o la carga neta) el 5-HI exhibió mayor eficacia que el NS-1738, este último fue más eficaz que el primero a nivel de corrientes unitarias (considerando como respuesta la duración de las aperturas y de los *bursts*). Incluso se han reportado casos como el del PAM-2, cuyo perfil macroscópico y su habilidad para reactivar receptores desensibilizados lo clasifica como PAM tipo II, pero a nivel de canal único no forma *clusters* como PNU-120596 o TQS, sino que induce aperturas y *bursts* similares a los del PAM tipo I NS-1738 (Andersen *et al.*, 2016). Esto demuestra que no siempre existe una correlación clara entre las corrientes macroscópicas y su origen microscópico para los PAMs tipo I y II.

A diferencia de lo que ocurre en la potenciación por PAMs tipo II donde la cinética sufre modificaciones a nivel macroscópico y microscópico, la falta de correlato en los cambios cinéticos de las corrientes unitarias observados en la potenciación por PAMs tipo I puede explicarse a través de la existencia de un mecanismo molecular de acción diferencial para ambos tipos de PAMs. Se ha propuesto que los PAMs tipo I disminuyen la barrera energética entre el estado cerrado y el estado abierto, aumentando la probabilidad de apertura del receptor; y/o incrementan la barrera energética entre el estado abierto y el estado desensibilizado (Introducción, págs.32-33, Fig. 14). Por un lado, un aumento en la velocidad de la transición cerrado-abierto explicaría la presencia de *bursts* por reaperturas rápidas y sucesivas del receptor que oscila entre ambos estados. Sin embargo, esto no justificaría el aumento en la duración de las aperturas, a menos que la reapertura del receptor ocurra tan rápidamente que no pueda ser temporalmente resuelta en los registros, provocando una prolongación artefactual del tiempo de estado abierto. Por otro lado, una disminución en la velocidad de la transición abierto-desensibilizado explicaría las aperturas prolongadas porque el receptor permanece durante mayor tiempo en el estado abierto, y puede cerrar y reabrir formando *bursts* previo a su paso al estado desensibilizado. Los PAMs I no desestabilizarían el estado desensibilizado, que continúa siendo muy estable energéticamente, por ello la terminación de los *bursts* ocurriría por desensibilización sin que se formen *clusters* de muy larga duración. Sin embargo, esta disminución en la velocidad de desensibilización no debería ser muy marcada, ya que no es observable a nivel del decaimiento de la corriente macroscópica. Además, como se mencionó previamente, es probable que la reducción notoria en el decaimiento de las corrientes potenciadas por PAMs tipo II se deba

mayoritariamente a la reactivación de receptores desensibilizados, y como los PAMs tipo I carecen de esta capacidad, la velocidad de decaimiento no se modifica de forma significativa. Aunque los PAMs tipo I no produjeron corrientes de reactivación propiamente dichas, a veces se detectaron mínimas corrientes generadas por la reapertura de la baja proporción de receptores cerrados presentes en el equilibrio de estados conformacionales en presencia de agonista, cuya activación se potencia por estar el PAM en el medio.

Respecto de la conductancia de las corrientes unitarias, como ambos tipos de PAMs prolongaron el tiempo de estado abierto, se observó una única población de amplitud mayoritaria que se correspondió con la amplitud máxima del receptor $\alpha 7$ completamente resuelta a nivel temporal (~10 pA). Tal como se mencionó anteriormente para el caso del 4BP-TQS y del TQS, un PAM tipo II estructuralmente relacionado, un único estudio ha reportado un incremento en la conductancia del receptor en presencia del modulador (Pałczyńska *et al.*, 2012), pero en general se afirma que los PAMs no producen efectos significativos sobre la amplitud de los canales.

Es posible afirmar que la tradicional clasificación de los PAMs en tipo I y II basada únicamente en los perfiles de corrientes macroscópicas potenciadas presenta sus limitaciones por varias razones. Por un lado, la velocidad de decaimiento determinada a nivel macroscópico no se correlaciona únicamente con la desensibilización, sino también con la reactivación del estado desensibilizado, además de exhibir gran variabilidad entre sistemas experimentales. Probablemente si se determinaran las constantes de decaimiento en configuración *outside-out* con rápida perfusión, podría detectarse la potencial modesta disminución en la velocidad de desensibilización que producirían los PAMs tipo I. Además, se han identificado compuestos con actividad $\alpha 7$ -PAM de comportamiento intermedio entre los tipos I y II a nivel macroscópico, por ejemplo incrementando el pico de corriente y disminuyendo la desensibilización cual PAMs tipo II, pero sin capacidad de reactivar receptores desensibilizados cual PAMs tipo I (Dunlop *et al.*, 2009; Malysz *et al.*, 2009; Dinklo *et al.*, 2011; Sahdeo *et al.*, 2014; Chatzidaki y Millar, 2015). Por otro lado, no siempre existe una correlación clara entre los perfiles de potenciación macroscópicos y su origen microscópico, ya que tanto los PAMs tipo II como los PAMs tipo I inducen cambios cinéticos a nivel de corrientes unitarias, pero sólo los PAMs tipo II lo hacen a nivel de corrientes macroscópicas. También se observa una falta de concordancia al evaluar la eficacia de los PAMs a ambos niveles, ya que, por ejemplo, para el PNU-120596 sí concuerdan los dos perfiles siendo el PAM de mayor eficacia (mayor aumento en el pico de corriente, en la carga neta y en la duración de aperturas y *clusters*); pero no para los PAMs tipo I, donde el orden de eficacia se invierte. Para todos los PAMs evaluados, a nivel de corrientes macroscópicas el orden de eficacia fue: PNU-120596 > 5-HI > NS-1738; mientras que a nivel de corrientes unitarias el orden de eficacia fue: PNU-120596 > NS-17378 > 5-HI.

Por todas las limitaciones mencionadas, es preciso considerar que la **clasificación de los PAMs** en únicamente dos clases puede constituir una simplificación extrema de un amplio espectro de moduladores de gran diversidad estructural y funcional, donde los prototipos de tipo I y II sean sólo los extremos de una serie de compuestos de comportamiento intermedio. Lo mismo podría desprenderse de sus **mecanismos moleculares de acción**, pues todos los PAMs podrían incrementar la probabilidad de apertura, disminuir la velocidad de desensibilización y recuperar receptores del estado desensibilizado en distinta medida de acuerdo a la estructura química del modulador y a las interacciones que establezcan con el receptor $\alpha 7$, predominando uno u otro mecanismo, o combinaciones de los mismos, y dando lugar a infinitas posibilidades de perfiles cinéticos de corrientes unitarias potenciadas. Esto resalta la importancia y la necesidad de complementar la caracterización de los PAMs a nivel macroscópico con el análisis a nivel de canal único, para obtener una aproximación más certera del mecanismo molecular de modulación alostérica.

Otro parámetro a considerar al momento de la caracterización farmacológica de los PAMs con potencial uso clínico es la **temperatura**, ya que se ha descrito que la potenciación de las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ por ambos tipos de PAMs se reduce a temperaturas más elevadas (Sitzia *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2012). En los resultados de la presente parte del capítulo I se descifró el origen microscópico diferencial de la dependencia a la temperatura por parte de los PAMs tipo I y II a nivel de corrientes unitarias, contrastando la potenciación a temperaturas más fisiológicas (34 °C) con respecto a la observada a temperatura ambiente (22 °C). Por un lado, la conductancia unitaria del canal potenciado por PAMs tipo I o II aumentó levemente a temperaturas más elevadas, debido a un incremento en la velocidad de difusión de los iones. Si bien esto podría traducirse en un leve aumento en el pico de corriente macroscópica, las mismas se ven disminuidas a temperaturas más elevadas, por ende, el origen molecular de dicha reducción claramente no se debió a cambios en la conductancia unitaria. Por otro lado, la cinética de los canales potenciados por los distintos tipos de PAMs experimentó una sensibilidad diferencial a la temperatura. En presencia del PAM tipo II PNU-120596 a temperaturas más fisiológicas, las aperturas prolongadas disminuyeron en duración y se agruparon formando únicamente *bursts* breves, con una completa ausencia de los *clusters* típicos de dicho modulador a temperatura ambiente. En cambio, a temperaturas más fisiológicas en presencia del PAM tipo I 5-HI, la duración de las aperturas potenciadas y de los *bursts* permaneció sin cambios, aunque la frecuencia de los episodios de activación disminuyó con respecto a la observada a temperatura ambiente. Por lo tanto, si bien la modulación por los dos tipos de PAMs disminuye a temperaturas más fisiológicas a nivel de corrientes macroscópicas, a nivel de corrientes unitarias el cambio es distinto en ambos tipos de PAMs. El efecto potenciador de los PAMs tipo I se ve menos afectado por la temperatura, disminuyendo únicamente la proporción de eventos potenciados; mientras que los

PAMs tipo II exhiben mayor sensibilidad porque los eventos potenciados disminuyen en probabilidad de apertura y principalmente en duración. Específicamente la duración de los episodios de activación sostenidos (*bursts/clusters*) resultó ser el parámetro con mayor sensibilidad a la temperatura.

Previamente se ha reportado la influencia de la temperatura en la desensibilización de distintos nAChRs, observándose una disminución de la desensibilización a bajas temperaturas y un aumento de la desensibilización a temperaturas más elevadas, independientemente del receptor (Gupta y Auerbach, 2011; Sitzia *et al.*, 2011; Jindrichova *et al.*, 2012). En cambio, sí se observó un efecto diferencial entre los nAChRs heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ y homoméricos $\alpha 7$ a nivel del pico de corriente macroscópica, ya que para los primeros aumenta mientras que para los segundos disminuye ante el aumento de la temperatura (Jindrichova *et al.*, 2012). Considerando que el principal efecto del aumento de temperatura consiste en incrementar la velocidad de desensibilización de los receptores, es posible explicar el impacto diferencial en los mecanismos moleculares de acción de ambos tipos de PAMs. Los PAMs tipo II ejercen su efecto potenciador por medio de una disminución en la velocidad de desensibilización y/o por una reactivación de receptores desensibilizados. Si la temperatura se eleva incrementando la velocidad de desensibilización, el mecanismo de acción del PAM tipo II se ve contrarrestado, el receptor desensibiliza más rápido sin permanecer tanto tiempo en el estado abierto y la reactivación se ve dificultada en un contexto donde prima la transición a un estado desensibilizado más estable, por lo cual los episodios de activación sólo alcanzan a formar *bursts* breves sin que puedan dar lugar a *clusters* de larga duración. Por su parte, los PAMs tipo I potencian favoreciendo la transición desde el estado cerrado al abierto y desfavoreciendo la transición al estado desensibilizado, pero sin desestabilizarlo, sino incrementando la barrera energética de ese pasaje, por lo cual no producen una disminución muy significativa de la desensibilización ni reactivan receptores desensibilizados. Como este mecanismo de acción es más independiente de los cambios en la desensibilización, los PAMs tipo I resultan más resistentes al aumento de temperatura, pudiendo potenciar las aperturas y los *bursts* de igual manera que a temperatura ambiente. Sin embargo, la mayor velocidad de desensibilización promueve un desplazamiento del equilibrio de conformaciones del receptor hacia el estado desensibilizado, disminuyendo la probabilidad de apertura y por ende la frecuencia o proporción de eventos potenciados, reduciendo globalmente la potenciación. Otra explicación alternativa podría radicar en la distinta afectación de la disociación de los PAMs tipo I y II de sus respectivos sitios de unión en el receptor a temperaturas más elevadas, ya sea por influencia en la estructura del PAM y/o en el sitio de unión. Además, la temperatura afecta el grado de fluidez de los lípidos de la membrana plasmática, los cuales interaccionan de forma íntima con el TMD del receptor (Barrantes, 2004) donde presuntamente se unen los PAMs tipo II, pudiendo provocar una disociación más rápida de este tipo de moduladores reduciendo su efecto. De todos modos, ambas alternativas podrían ocurrir simultáneamente, dado que es probable que la mayor fluidez de los lípidos de la membrana sea

responsable del incremento en la velocidad de desensibilización del receptor, afectándose diferencialmente tanto la disociación de los PAMs de sus sitios de unión, como sus mecanismos moleculares de acción. Es así que la caracterización farmacológica de los PAMs *in vitro* a temperaturas fisiológicas se propone como crucial para una mejor extrapolación de los efectos que exhibirán *in vivo*, ya que la eficacia de los potenciadores será menor en comparación a la determinada a temperatura ambiente. En particular, esto puede resultar beneficioso en el caso de los PAMs tipo II, ya que al no disminuir desmedidamente la desensibilización se evitaría la potencial citotoxicidad de los compuestos (Hu *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2012; Bouzat *et al.*, 2018).

Aunque respecto a los **sitios de unión de los PAMs tipo I y II** aún existan notorias controversias por la falta de una estructura cristalina del receptor $\alpha 7$ en presencia de los moduladores (Introducción, págs. 34-35), el empleo de receptores quiméricos y mutantes en estudios electrofisiológicos han permitido la identificación de **determinantes estructurales de potenciación**. A nivel del TMD se localizan residuos importantes para la potenciación por PAMs tipo II, siendo ampliamente aceptado su sitio de unión en la cavidad transmembrana, razón por la cual el PNU-120596 no potencia al receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A y sí a la quimera reversa 5HT₃A- $\alpha 7$ activada por la ACh (Bertrand *et al.*, 2008). Además del TMD, la interfaz ECD-TMD correspondiente a $\alpha 7$ en quimeras de un receptor *Cys-loop* procarriota y $\alpha 7$ también resultó crucial para la potenciación por el PNU-120596 y otros PAMs que se unen a la cavidad transmembrana (Tillman *et al.*, 2014). La construcción del receptor quintuple mutante **$\alpha 7$ TSLMF** permitió detallar aún más los determinantes estructurales de la potenciación por el PNU-120596, identificándose cinco residuos transmembrana que, tras ser mutados, tornan al receptor insensible a la potenciación (S223T, A226S, M254L, I281M y V288F) (DaCosta *et al.*, 2011).

En los resultados expuestos en la presente parte del capítulo I se contrastaron los efectos del PNU-120596, 5-HI y NS-1738 en el receptor $\alpha 7$ TSLMF para evaluar la influencia de los cinco determinantes estructurales transmembrana en la potenciación. Llamativamente, aún se observó potenciación por parte del PNU-120596 sobre el receptor quintuple mutante, aunque sin *clusters* de larga duración, pese a haber sido descrito como “insensible” al efecto del modulador (DaCosta *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se comparó el grado de potenciación en $\alpha 7$ TSLMF con respecto al observado en $\alpha 7$ WT, el efecto del PNU-120596 sí resultó prácticamente nulo, comprobando que los cinco residuos constituyen efectivamente determinantes estructurales de la potenciación, y que la forma más correcta de evaluar los mismos es comparando el grado de potenciación relativo a $\alpha 7$ en lugar de basarse únicamente en la potenciación con respecto al quintuple mutante en ausencia de PAMs. Con respecto a los PAMs tipo I, el 5-HI fue el más efectivo potenciando a $\alpha 7$ TSLMF, aunque su grado de potenciación disminuyó en ~50 % con respecto al ejercido sobre el receptor $\alpha 7$ WT, y el NS-1738 potenció al quintuple mutante en muy baja proporción, habiendo disminuido notablemente su

grado de potenciación con respecto al ejercido sobre el receptor $\alpha 7$ WT. Estos resultados permiten inferir que los determinantes estructurales a nivel del TMD no son exclusivos de los PAMs tipo II, sino que también disminuyen la capacidad potenciadora de los PAMs tipo I. A su vez, se diferencian claramente dos perfiles de PAMs tipo I, ya que el 5-HI resulta menos afectado por los determinantes estructurales transmembrana, mientras que el NS-1738 fue notoriamente afectado, comportándose de forma muy similar al PNU-120596. Es posible que este comportamiento diferencial radique en las diferencias estructurales entre ambos PAMs tipo I, puesto que el NS-1738 y el PNU-120596 son ambos derivados de la urea, mientras que el 5-HI es una molécula polar de menor tamaño.

Se puede afirmar que los PAMs tipo I resultan ser los más controversiales, porque su potenciación está influenciada por determinantes estructurales a nivel del ECD, de la interfaz ECD-TMD y del TMD. Por un lado, se ha reportado que tanto el 5-HI como el NS-1738 potencian al receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A, sugiriendo inicialmente un rol preponderante de la porción N-terminal del ECD (Grønlien *et al.*, 2007; Bertrand *et al.*, 2008). También la presencia adicional del *loop* M2-M3 de la interfaz ECD-TMD de $\alpha 7$ en la quimera favorece la potenciación por el NS-1738, sin afectar la del 5-HI (Bertrand *et al.*, 2008). Además, el NS-1738 no es capaz de potenciar a la quimera reversa 5HT₃A- $\alpha 7$ activada por la ACh (Bertrand *et al.*, 2008). Por otro lado, los hallazgos aquí expuestos sobre la influencia de los determinantes transmembrana en la potenciación por PAMs tipo I también ha sido advertida previamente. En el caso del 5-HI, una mutación puntual en el segmento M2 de $\alpha 7$ por el residuo correspondiente al de la subunidad β del nAChR muscular (T6'F) es suficiente para abolir la potenciación por dicho PAM I (Placzek *et al.*, 2004). En el caso del NS-1738, se demostró competencia por el sitio de unión con el PNU-120596, sugiriendo que este PAM I también se uniría en la cavidad transmembrana, pero en una posición ligeramente superior, solapando parcialmente con el sitio del PAM tipo II localizado más profundamente. Incluso S223M, A226D y M254L, tres de los residuos mutados en $\alpha 7$ TSLMF, fueron localizados en esa posible zona de solapamiento (Collins *et al.*, 2011). Además, se ha descrito la unión de otros PAMs tipo I, como la IVM y el LY-2087101, a la cavidad transmembrana del TMD (Krause *et al.*, 1998; Collins y Millar, 2010; Collins *et al.*, 2011).

Por lo tanto, aunque algunos estudios proponen la existencia de sitios de unión y determinantes estructurales distintos para los PAMs tipo I y II, otras evidencias sugieren que ambos podrían unirse a los mismos sitios con cierto grado de solapamiento y/o presentar determinantes estructurales similares, postulándose a la cavidad transmembrana como principal sitio alostérico de unión a distintos niveles. En ese caso, el efecto deletéreo que se observa para algunos PAMs I al afectar la integridad del ECD y/o de la interfaz ECD-TMD se debería únicamente a su influencia en el mecanismo de transducción de señal que tiene lugar durante la potenciación (Young *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2011; Chatzidaki *et al.*, 2015; Chatzidaki y Millar, 2015). También se han postulado modelos con dos sitios alostéricos de unión, ya que estudios de dinámica molecular mostraron que los PAMs tipo II requerían

unirse a la interfaz ECD-TMD además de a la cavidad del TMD para ejercer potenciación efectiva (Targowska-Duda *et al.*, 2018).

En síntesis, la activación y la potenciación del receptor $\alpha 7$ constituyen alternativas terapéuticas invaluable en condiciones patológicas donde exista una señalización colinérgica deficiente. Actualmente, el foco de interés se ha trasladado al uso de ligandos alostéricos, en particular a los PAMs, pues brindan mayor seguridad al carecer de actividad intrínseca y mantener el patrón espaciotemporal de la activación ortostérica endógena, mientras que los agonistas alostéricos se reservarían para casos donde los niveles de agonista ortostérico sean considerablemente bajos. Los resultados aquí expuestos contribuyen al desciframiento y comprensión de los **mecanismos moleculares** subyacentes a los procesos de **activación y modulación alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico**, lo cual constituye un requisito esencial para continuar con el desarrollo estos compuestos potencialmente terapéuticos.

PARTE II: Modulación alostérica por flavonoides

Antecedentes y objetivos específicos

En la actualidad, una creciente evidencia experimental y epidemiológica sustenta numerosos efectos benéficos de la ingesta dietaria de **flavonoides**, incluyendo mejoras en cognición, memoria y aprendizaje; protección ante diversas enfermedades crónicas; y reducción del declive neurológico asociado al envejecimiento (Spencer *et al.*, 2009; Ebrahimi y Schluesener, 2012; Vauzour *et al.*, 2015; Flanagan *et al.*, 2018; Gildawie *et al.*, 2018; Bakoyiannis *et al.*, 2019). Estos compuestos naturales actúan como **agentes antioxidantes** y **antiinflamatorios** potentes, ejerciendo un **efecto neuroprotector**, tanto *in vitro* como *in vivo*, que resulta beneficioso en el contexto de desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Rossi *et al.*, 2008; Ebrahimi y Schluesener, 2012; Spencer *et al.*, 2012; Dajas-Bailador *et al.*, 2013; Vauzour *et al.*, 2015; Bakhtiari *et al.*, 2017; Kujawska y Jodynis-Liebert, 2018; Bakoyiannis *et al.*, 2019).

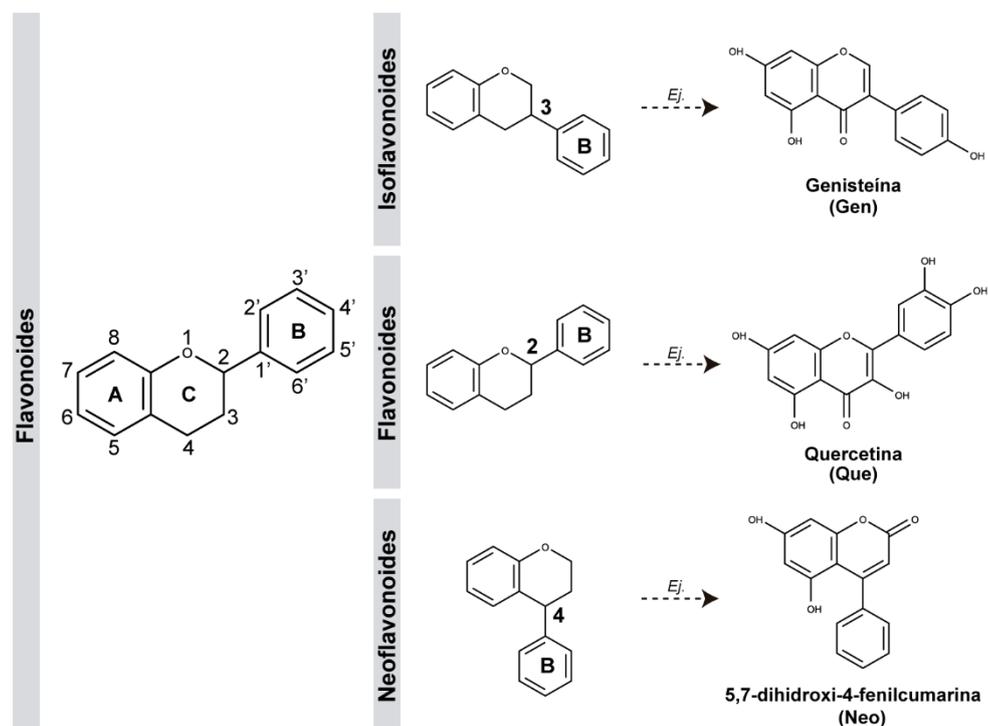


Figura I.II.1. Estructura y clasificación de los flavonoides. Se muestran la estructura del esqueleto carbonado básico de los flavonoides y las estructuras de las tres clases según la clasificación de la IUPAC. En el extremo derecho se pueden observar los flavonoides prototipo de cada clase utilizados en la parte II del capítulo I.

Los flavonoides son compuestos naturales polifenólicos, ubicuamente presentes en plantas, derivados de un esqueleto base constituido por 15 átomos de carbono (C6-C3-C6 o fenil-1-benzopirano), el cual comprende dos anillos bencénicos (A y B) y un anillo pirano con un átomo de oxígeno (C) (Figura I.II.1). Los anillos A y C están fusionados formando el motivo benzopirano, mientras que el anillo B constituye el sustituyente fenilo sobre el anillo C. Como en general los flavonoides

poseen un grupo carbonilo en el anillo C conformando una pirona, suelen considerarse derivados de la estructura 2-fenil- γ -benzopirona. La **IUPAC** (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) clasifica los flavonoides en tres clases según la posición del anillo B sobre el benzopirano (Figura I.II.1): **flavonoides** (en el sentido estricto, anillo B en posición 2), **isoflavonoides** (anillo B en posición 3) y **neoflavonoides** (anillo B en posición 4) (Rauter *et al.*, 2018). Existe otra clasificación más tradicional, basada en el patrón de hidroxilación y el estado de oxidación del anillo C, que distribuye los flavonoides e isoflavonoides en seis subclases: flavanoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianinas (Corcoran *et al.*, 2012; Panche *et al.*, 2016). Sin embargo, esta clasificación no incluye a los neoflavonoides, denominados también 4-fenilcumarinas.

Muchos de los efectos benéficos de los flavonoides han sido tradicionalmente atribuidos a su capacidad antioxidante intrínseca, tanto a nivel directo capturando radicales libres o quelando metales, como a nivel indirecto modulando enzimas como la xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, etc. (Dajas-Bailador *et al.*, 2013). Sin embargo, se han identificado otros efectos ejercidos por los flavonoides que refuerzan su rol antioxidante y neuroprotector, incluyendo la modulación de diversas vías de señalización, factores de transcripción y expresión génica (Williams *et al.*, 2004; Ebrahimi y Schluesener, 2012; Spencer *et al.*, 2012; Dajas-Bailador *et al.*, 2013; Vauzour *et al.*, 2015; Bakhtiari *et al.*, 2017; Flanagan *et al.*, 2018; Bakoyiannis *et al.*, 2019). Esto se sustenta además porque las concentraciones alcanzadas *in vivo* por los flavonoides son menores a las requeridas para su actividad antioxidante directa, indicando que sus acciones protectoras evidentemente involucran mecanismos adicionales de señalización (Williams *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2012; Dajas-Bailador *et al.*, 2013; Flanagan *et al.*, 2018). Entre estos procesos, se ha observado que los flavonoides modulan directamente muchos receptores de NT y canales iónicos (Huang *et al.*, 1999; Huang y Dillon, 2000; Goutman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005, 2007; Shin *et al.*, 2010; Hanrahan *et al.*, 2011; Johnston, 2015).

Existen escasos reportes documentando efectos de flavonoides sobre el receptor $\alpha 7$, específicamente referidos a la genisteína y la quercetina, las cuales incrementan las corrientes macroscópicas evocadas por la ACh (Grønlien *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). Llamativamente, este efecto modulador pareciera ser bastante específico para $\alpha 7$ entre los pLGICs, ya que la genisteína inhibe los receptores GABA_A (Huang *et al.*, 1999), Gly (Huang y Dillon, 2000), 5-HT_{3A}, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ (Grønlien *et al.*, 2007); mientras que la quercetina inhibe los receptores 5-HT_{3A} (Lee *et al.*, 2005, 2008), Gly (Lee *et al.*, 2007), GABA_A (Goutman *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2015), nicotínico muscular (Lee, Shin, *et al.*, 2011), $\alpha 3\beta 4$ (Lee, Hwang, *et al.*, 2011), $\alpha 4\beta 2$ (Goutman *et al.*, 2003) y $\alpha 9\alpha 10$ (Lee, Choi, *et al.*, 2011).

A pesar de que tanto los **flavonoides** como la **señalización colinérgica mediada por el receptor $\alpha 7$** están claramente involucrados en los mismos procesos fisiológicos asociados a cognición, memoria y aprendizaje; y en los mismos procesos fisiopatológicos, ejerciendo neuroprotección y modulando

mecanismos oxidativos e inflamatorios; sólo escasos estudios se han focalizado en identificar el potencial vínculo o conexión entre los efectos benéficos de ambos. En esta segunda parte del capítulo I se evalúan los **mecanismos moleculares de acción de los flavonoides sobre el receptor $\alpha 7$ homomérico**, ya que pueden constituir una alternativa terapéutica natural de interés, y/o una plataforma para el desarrollo y optimización de nuevos compuestos sintéticos que promuevan la modulación alostérica positiva del receptor. Para ello se utilizaron prototipos de cada clase de flavonoides según la clasificación de la IUPAC: la isoflavona **genisteína (Gen)** como isoflavonoide, el flavonol **quercetina (Que)** como flavonoide y la **5,7-dihidroxi-4-fenilcumarina (Neo)** como neoflavonoide (Figura I.II.1). En tanto, los **objetivos específicos de la parte II** consisten en:

- Describir farmacológicamente y contrastar los efectos de las tres clases de flavonoides sobre el receptor $\alpha 7$ homomérico, estableciendo órdenes de potencia y eficacia a nivel de corrientes macroscópicas.
- Describir y contrastar los efectos de las tres clases de flavonoides sobre el receptor $\alpha 7$ homomérico a nivel de corrientes unitarias.
- Evaluar los determinantes estructurales de la modulación alostérica positiva de $\alpha 7$ por los flavonoides utilizando los receptores quiméricos $\alpha 7$ -5HT₃A HC y quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF.
- Evaluar el efecto antioxidante de los flavonoides, por vías independientes de $\alpha 7$ o mediadas por el receptor, a través de la medición de la tasa de generación de ROS intracelulares.

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DEL EFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE EL RECEPTOR $\alpha 7$ HOMOMÉRICO

1.1. Potenciación de corrientes macroscópicas

Dado que los ovocitos de *Xenopus laevis* constituyen un sistema propicio para el *screening* rápido de drogas, la caracterización farmacológica inicial de los flavonoides fue realizada utilizando la técnica de TEVC automatizado en el equipo HiClamp. Se registraron las **corrientes macroscópicas** de $\alpha 7$ evocadas por la ACh a un potencial de membrana de -60 mV, variando las concentraciones de los compuestos polifenólicos (0,1-200 μ M) para construir las curvas de concentración-respuesta por dos protocolos: coaplicación y preincubación más coaplicación.

Utilizando el protocolo de coaplicación, se observó que los tres flavonoides, Gen, Que y Neo, incrementaron el pico de la corriente macroscópica evocada por ACh 30 μ M de forma concentración-dependiente (Figura I.II.2, Tabla I.II.1). La coaplicación de las drogas fue realizada por 20 s, durante los cuales las corrientes se activaron y decayeron completamente (Figura I.II.2A).

Luego se realizó el protocolo de preincubación más coaplicación, donde los ovocitos fueron preincubados por 10 s con los flavonoides, antes de la coaplicación de los mismos con el agonista por 20 s. En este caso también se observó potenciación de las corrientes evocadas por la ACh de forma concentración-dependiente (Figura I.II.2B, Tabla I.II.1). Además, durante el paso previo de preincubación únicamente con la solución de flavonoides no se generaron corrientes, descartando un rol de estos compuestos como agonistas.

Los resultados obtenidos por ambos protocolos evidenciaron que los tres tipos de **flavonoides** exhiben **actividad $\alpha 7$ -PAM**, incrementando el pico de las corrientes de ACh en $\sim 1,5$ -2 veces (Figura I.II.2B, Tabla I.II.1). No se observaron diferencias significativas en los valores de CE_{50} y de máxima potenciación para cada flavonoide entre ambos protocolos, lo cual indica que la coaplicación de los flavonoides con el agonista es suficiente para que ejerzan su acción ($p > 0,05$). El orden de potencia para el efecto potenciador de los flavonoides en el protocolo de coaplicación fue Gen \sim Neo $>$ Que ($p < 0,01$), aunque no hubo diferencias significativas en las CE_{50} obtenidas por el protocolo con preincubación ($p > 0,05$). Por lo tanto, se concluye que el **rango de potencia** entre los flavonoides fue de Gen \sim Neo \geq Que (Tabla I.II.1). El **rango de eficacia**, considerando como respuesta al pico de corriente, resultó ser Gen \sim Que $>$ Neo para los dos protocolos ($p < 0,001$ en ambos casos) (Tabla I.II.1).

Estos resultados revelaron que los compuestos prototipo de las distintas clases de flavonoides incrementan la amplitud de la corriente evocada por el agonista, lo cual es consistente con su accionar como PAMs del receptor $\alpha 7$ (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Faghieh *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2011b; Chatzidaki y Millar, 2015; Bouzat *et al.*, 2018). Como se explicó en la parte I del presente

capítulo, los ovocitos de *Xenopus* no constituyen un sistema propicio para el correcto análisis cinético de las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$, por lo cual, para determinar con precisión las constantes de decaimiento en presencia de los flavonoides y establecer su clasificación como PAMs tipo I o II, se realizaron registros en células BOSC23.

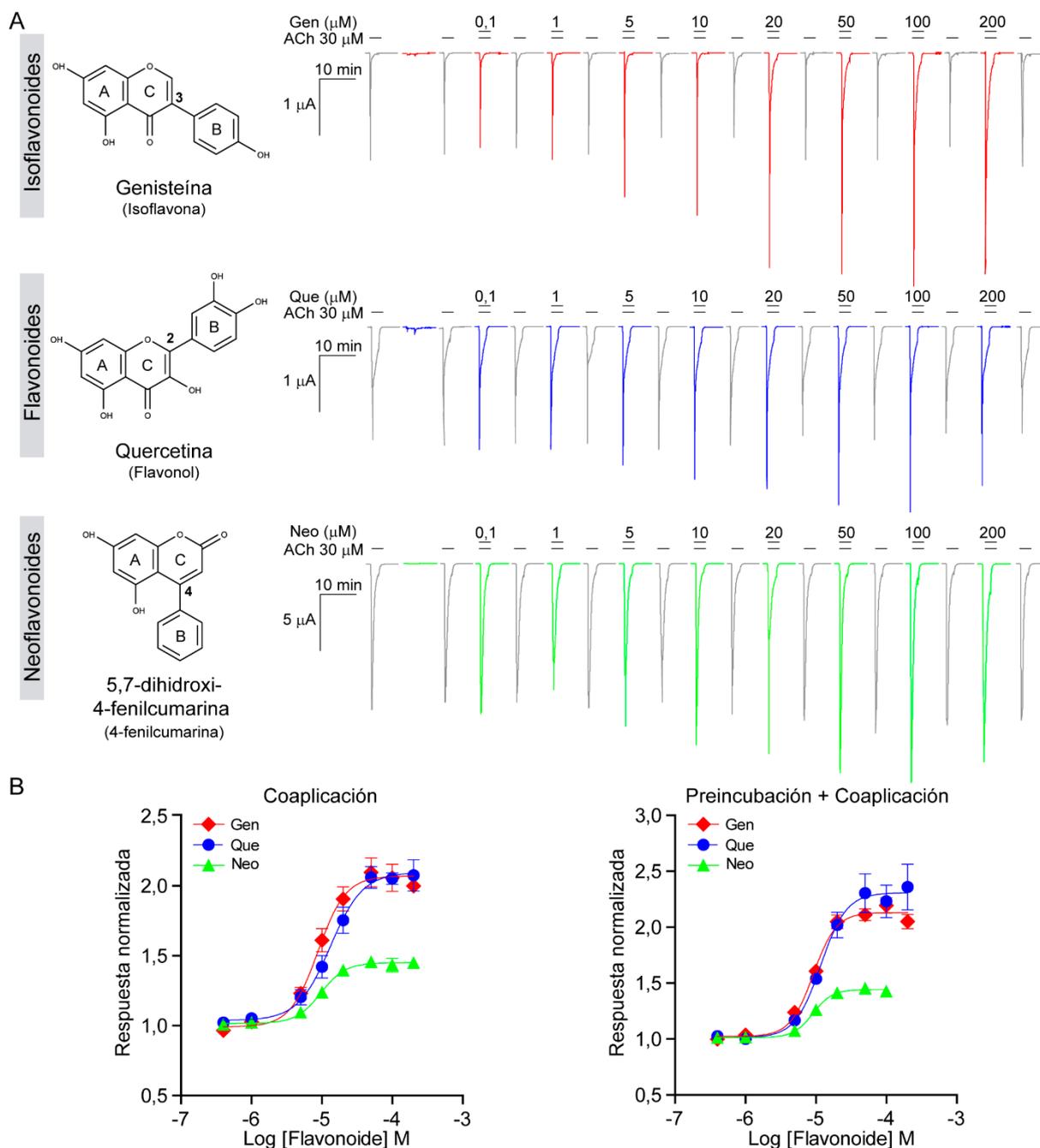


Figura I.II.2. Efecto de los flavonoides sobre las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ evocadas por ACh en ovocitos de *Xenopus*. **A-** Estructuras químicas de los compuestos prototipo de cada clase de flavonoide (izquierda) y corrientes macroscópicas representativas evocadas por ACh 30 μ M sola (corrientes de control en gris) o combinada con distintas concentraciones de los flavonoides (corrientes experimentales en color) en el protocolo de coaplicación. Potencial de membrana: -60 mV. **B-** Curvas de concentración-respuesta obtenidas aplicando el protocolo de coaplicación solo (izquierda) o con el paso previo de preincubación (derecha). Los datos se muestran como el promedio \pm SEM del pico de la corriente experimental normalizado al pico de la corriente de control.

Se realizaron registros en configuración *whole-cell* a un potencial de membrana de -50 mV para obtener las **corrientes macroscópicas en células BOSC23**. Para estudiar el efecto de los flavonoides sobre las mismas se seleccionó la concentración 50 μ M, la cual exhibió máxima actividad potenciadora para los tres compuestos de acuerdo a las curvas concentración-respuesta realizadas en ovocitos. La concentración de ACh empleada fue 100 μ M, la cual se corresponde con su CE_{50} . El protocolo utilizado fue el de coaplicación, ya que no se detectaron diferencias significativas entre los dos protocolos evaluados en ovocitos, y como la Gen y la Que pueden actuar como inhibidores de tirosina quinasas, la coaplicación simultánea disminuye el tiempo de exposición de la célula a los flavonoides, reduciendo la probabilidad de que ocurra la inhibición de las quinasas y una consecuente modificación en el estado de fosforilación del receptor (Huang *et al.*, 1999; Huang y Dillon, 2000; Grønlien *et al.*, 2007, 2010).

En el caso de la **Gen**, el pico de corriente se incrementó en $\sim 1,4$ veces ($p < 0,01$) y la carga neta en $\sim 1,9$ veces ($p < 0,001$) con respecto a la corriente de control. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las constantes de decaimiento rápido ni lento en presencia de la Gen ($\tau_{\text{rápido}} = 56 \pm 20$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 728 \pm 218$ ms) comparadas con las de la corriente de control en su ausencia ($\tau_{\text{rápido}} = 53 \pm 21$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 1062 \pm 739$ ms). La relación carga neta/pico fue de $\sim 1,45$ (Figura I.II.3A, Tabla I.II.1).

En presencia de la **Que**, el pico de corriente se incrementó en $\sim 1,2$ veces ($p < 0,01$) y la carga neta no exhibió diferencias significativas respecto a la corriente de control ($p > 0,05$). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las constantes de decaimiento rápido ni lento en presencia de la Que ($\tau_{\text{rápido}} = 61 \pm 32$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 771 \pm 397$ ms) comparadas con las de la corriente de control en su ausencia ($\tau_{\text{rápido}} = 47 \pm 10$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 1235 \pm 694$ ms). La relación carga neta/pico fue de $\sim 0,95$ (Figura I.II.3A, Tabla I.II.1).

En el caso del **Neo**, el pico de corriente y la carga neta se incrementaron de forma significativa en $\sim 1,2$ y $\sim 1,9$ veces respectivamente. Por el contrario, las constantes de decaimiento rápido y lento en presencia del Neo no exhibieron diferencias significativas ($\tau_{\text{rápido}} = 37 \pm 11$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 1089 \pm 769$ ms) con respecto a las constantes de la corriente de control ($\tau_{\text{rápido}} = 42 \pm 7$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 1037 \pm 653$ ms). La relación carga neta/pico fue de $\sim 1,51$ (Figura I.II.3A, Tabla I.II.1).

Al comparar las tres clases de flavonoides entre sí no se detectaron diferencias significativas en los incrementos en el pico de la corriente ($p > 0,05$), pero la tendencia en el rango u orden de eficacia de potenciación fue: Gen > Que \sim Neo.

Además, mediante el protocolo de **reactivación del estado desensibilizado** se evaluó la capacidad de los flavonoides para generar corrientes de reactivación tras la desensibilización del receptor en presencia del agonista, ya que esta propiedad permite diferenciar los PAMs tipo I y II (Young *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2011; Chatzidaki *et al.*, 2015; Andersen *et al.*, 2016). Las corrientes

de reactivación inducidas por los flavonoides fueron muy pequeñas (Figura I.II.3B), exhibiendo valores de pico con respecto a la corriente de control de $0,40 \pm 0,24$ veces para la Gen ($n = 5, N = 5$), $0,34 \pm 0,13$ veces para la Que ($n = 5, N = 5$) y $0,39 \pm 0,24$ veces para el Neo ($n = 5, N = 5$).

Parámetro	Protocolo	Genisteína	Quercetina	Neoflavonoide
Corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ expresado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>				
CE ₅₀ (μ M)	Coap	9,36 \pm 0,81	15,39 \pm 2,03 [#]	9,64 \pm 0,66 ^{&&}
	Pre + Coap	10,15 \pm 0,79	11,45 \pm 0,52	9,15 \pm 0,63
Coeficiente de Hill	Coap	2,98 \pm 0,34	2,12 \pm 0,23	3,16 \pm 0,34
	Pre + Coap	2,53 \pm 0,20	2,33 \pm 0,19	4,04 \pm 0,58
Máxima Potenciación	Coap	2,08 \pm 0,09 ^{***}	2,13 \pm 0,07 ^{***}	1,46 \pm 0,03 ^{*** ### &&&}
	Pre + Coap	2,18 \pm 0,05 ^{***}	2,30 \pm 0,14 ^{***}	1,45 \pm 0,02 ^{***}
% Máxima Potenciación	Coap	208 \pm 9 ^{***}	213 \pm 7 ^{***}	146 \pm 3 ^{***}
	Pre + Coap	218 \pm 5 ^{***}	230 \pm 14 ^{***}	145 \pm 2 ^{***}
<i>n</i>	Coap	11	8	10
	Pre + Coap	16	8	9
<i>N</i>	Coap	4	3	3
	Pre + Coap	4	3	3
Corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ expresado en células BOSC23				
Pico de corriente (veces)	Coap	1,38 \pm 0,28 ^{**}	1,25 \pm 0,17 ^{**}	1,25 \pm 0,14 ^{***}
Carga neta (veces)	Coap	1,91 \pm 0,62 ^{***}	1,18 \pm 0,25	1,86 \pm 0,30 ^{***}
Relación carga neta/pico	Coap	1,45 \pm 0,61	0,95 \pm 0,14	1,51 \pm 0,34
τ rápido (ms)	Coap	56 \pm 20	61 \pm 32	37 \pm 11
τ lento (ms)	Coap	728 \pm 218	771 \pm 397	1089 \pm 769
<i>n</i>	Coap	8	7	7
<i>N</i>	Coap	4	4	4

Tabla I.II.1. Modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7$ por flavonoides a nivel de corrientes macroscópicas.

Porción superior: Corrientes macroscópicas registradas en ovocitos de *Xenopus*. Concentración de ACh: 30 μ M. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas respecto de la condición control (*). Para comparaciones entre las tres clases de flavonoides se utilizó ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (# y & indican diferencias significativas respecto de las condiciones Gen y Que respectivamente).

Porción inferior: Corrientes macroscópicas registradas en células BOSC23. Concentración de ACh: 100 μ M. Los datos se muestran como el promedio \pm SD La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control (*).

En resumen, las **tres clases de flavonoides** incrementaron el pico de corriente, no modificaron las constantes de decaimiento ni por ende la velocidad de desensibilización, y no reactivaron significativamente los receptores desde el estado desensibilizado, confirmando el rol de estos compuestos naturales como **PAMs tipo I** del receptor $\alpha 7$. Esto se encuentra en línea con los únicos reportes previos sobre Gen (Grønlien *et al.*, 2007) y Que (Lee *et al.*, 2010). Además, la relación carga neta/pico fue ~ 1 , como es esperable para los PAMs tipo I (Papke y Porter Papke, 2002; Andersen *et al.*, 2016).

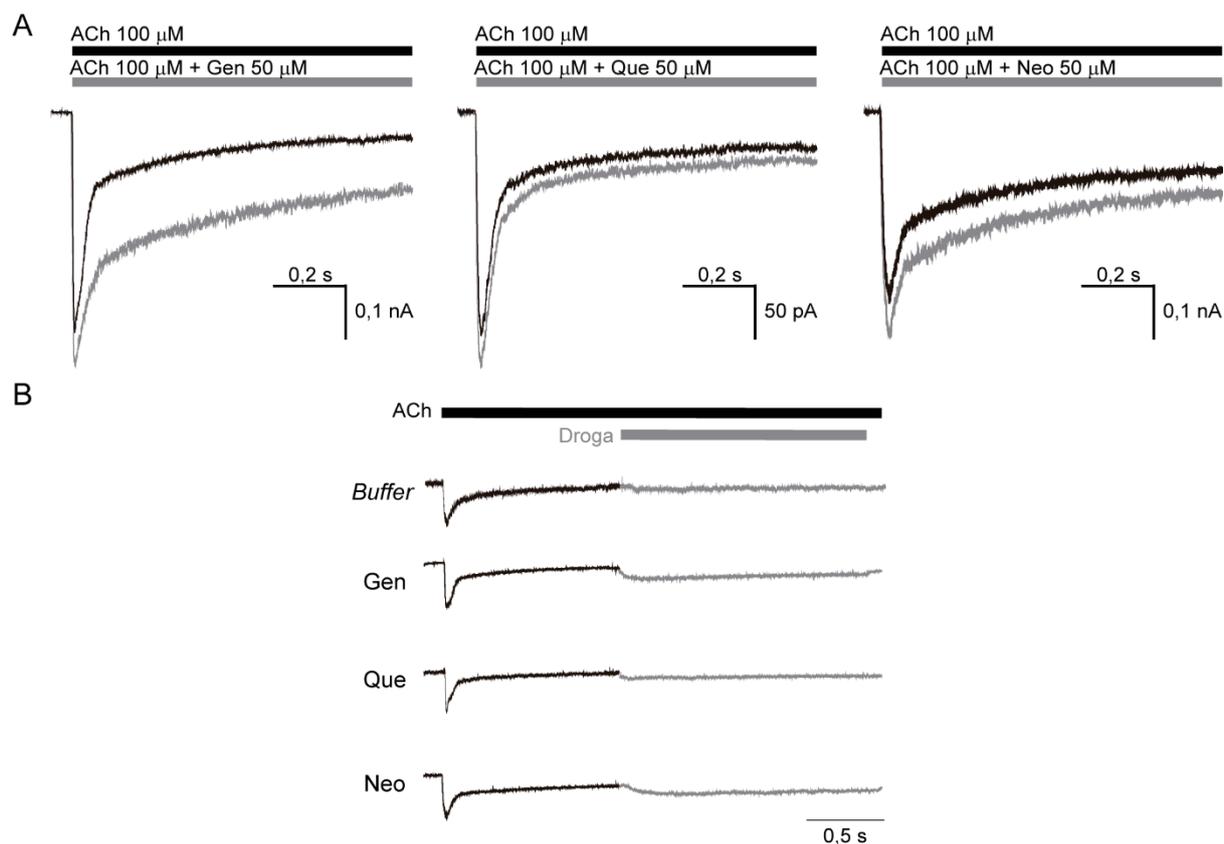


Figura I.II.3. Potenciación y recuperación de la desensibilización del receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes macroscópicas en células BOSC23. A- Corrientes macroscópicas representativas de control por ACh (negro) y experimentales por coaplicación de ACh con flavonoides (gris). Las barras horizontales en negro y gris indican los períodos de aplicación del agonista y del flavonoide respectivamente. Potencial de membrana: -50 mV. B- Protocolo de reactivación del estado desensibilizado. Las corrientes de control de ACh (negro) fueron normalizadas para poder comparar las corrientes de reactivación de las distintas condiciones (gris). Las barras horizontales en negro y en gris indican los períodos de aplicación del agonista y del flavonoide respectivamente. Potencial de membrana: -50 mV.

1.2. Potenciación de corrientes unitarias

Para descifrar el mecanismo molecular de modulación alostérica de los flavonoides se realizaron registros de **corrientes unitarias del receptor $\alpha 7$ homomérico** por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 a un potencial de membrana de -70 mV. Se utilizó ACh en la concentración correspondiente a su CE_{50} ($100 \mu\text{M}$) y los flavonoides en concentraciones dentro del rango 5 - $100 \mu\text{M}$ (Figura I.II.4, Tabla I.II.2). Las diferencias significativas en el grado de potenciación entre las distintas concentraciones del rango para cada flavonoide fueron determinadas por ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni ($p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p < 0,01$ para las duraciones tanto de aperturas como de *bursts* entre las concentraciones de Gen, Que y Neo respectivamente).

En presencia de **Gen**, las aperturas del receptor $\alpha 7$ evocadas por la ACh se prolongaron marcadamente, agrupándose en episodios de activación o *bursts* potenciados (Figura I.II.4A). La

potenciación se evidenció en la totalidad del rango de concentraciones evaluado, a nivel tanto de las aperturas ($p < 0,001$) como de los *bursts* ($p < 0,001$) partiendo de la concentración 5 μM (Tabla I.II.2). Los histogramas de estado abierto se ajustaron con tres componentes exponenciales, mientras que los histogramas de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales para Gen 5-10 μM y con cuatro componentes exponenciales para Gen 25-100 μM (Figura I.II.4A). El $\tau_{\text{crítico}}$ se definió en la intersección entre los componentes segundo y tercero del histograma de estado cerrado ($\sim 1-5$ ms). La potenciación máxima se alcanzó a partir de Gen 25 μM y se mantuvo hasta Gen 100 μM inclusive. Las duraciones promedio de las aperturas y de los *bursts* resultaron ser ~ 6 y ~ 35 veces mayores respectivamente que las del receptor $\alpha 7$ activado por la ACh en ausencia de flavonoides ($p < 0,001$ en cada caso) (Figura I.II.4, Tabla I.II.2).

En presencia de **Que** no se detectaron cambios a 5 μM ($p > 0,05$) y la potenciación se evidenció recién a partir de 10 μM ($p < 0,05$), lo cual se correlaciona con la menor potencia de la Que con respecto a la Gen determinada por las curvas de concentración-respuesta. Los histogramas de duración de aperturas y de *bursts* en presencia de la Que a concentraciones activas (10-100 μM) fueron ajustados con tres componentes exponenciales (Figura I.II.4A). El $\tau_{\text{crítico}}$ se definió en la intersección entre los componentes segundo y tercero del histograma de estado cerrado ($\sim 1-5$ ms). Si bien a Que 10 μM se observó potenciación significativa ($p < 0,05$), el máximo efecto fue alcanzado a partir de 25 μM , con un aumento de ~ 3 y ~ 10 veces en la duración de las aperturas y de los *bursts* respectivamente ($p < 0,001$ en cada caso) (Figura I.II.4, Tabla I.II.2).

En presencia de **Neo**, la potenciación se evidenció desde 10 μM en la duración del *burst*, pero no en las aperturas. En el rango 25-50 μM de Neo se alcanzó la máxima potenciación, con un incremento de las duraciones de las aperturas individuales y de los *bursts* de ~ 2 y ~ 8 veces respectivamente ($p < 0,001$ en cada caso) (Figura I.II.4, Tabla I.II.2). Los histogramas de estado abierto y de *bursts* en presencia de concentraciones activas del Neo (25-100 μM) fueron ajustados con tres componentes exponenciales (Figura I.II.4A). El $\tau_{\text{crítico}}$ se definió en la intersección entre los componentes segundo y tercero del histograma de estado cerrado ($\sim 1-5$ ms). A 100 μM del Neo se observó una disminución de la potenciación, la cual podría explicarse por bloqueo adicional a altas concentraciones del flavonoide.

En resumen, **a nivel cinético de las corrientes unitarias** se observó que los tres flavonoides prolongaron el tiempo de estado abierto e indujeron la activación del receptor en episodios de larga duración o *bursts*, al igual que se ha reportado previamente para los prototipos de **PAMs tipo I** como el 5-HI y el NS-1738. Además, comparando la máxima potenciación ejercida por los flavonoides a 50 μM y considerando como respuesta las duraciones de las aperturas y de los *bursts*, se estableció el

siguiente rango de eficacia: Gen > Que \geq Neo, en concordancia con la tendencia observada en las corrientes macroscópicas (Figura I.II.4B).

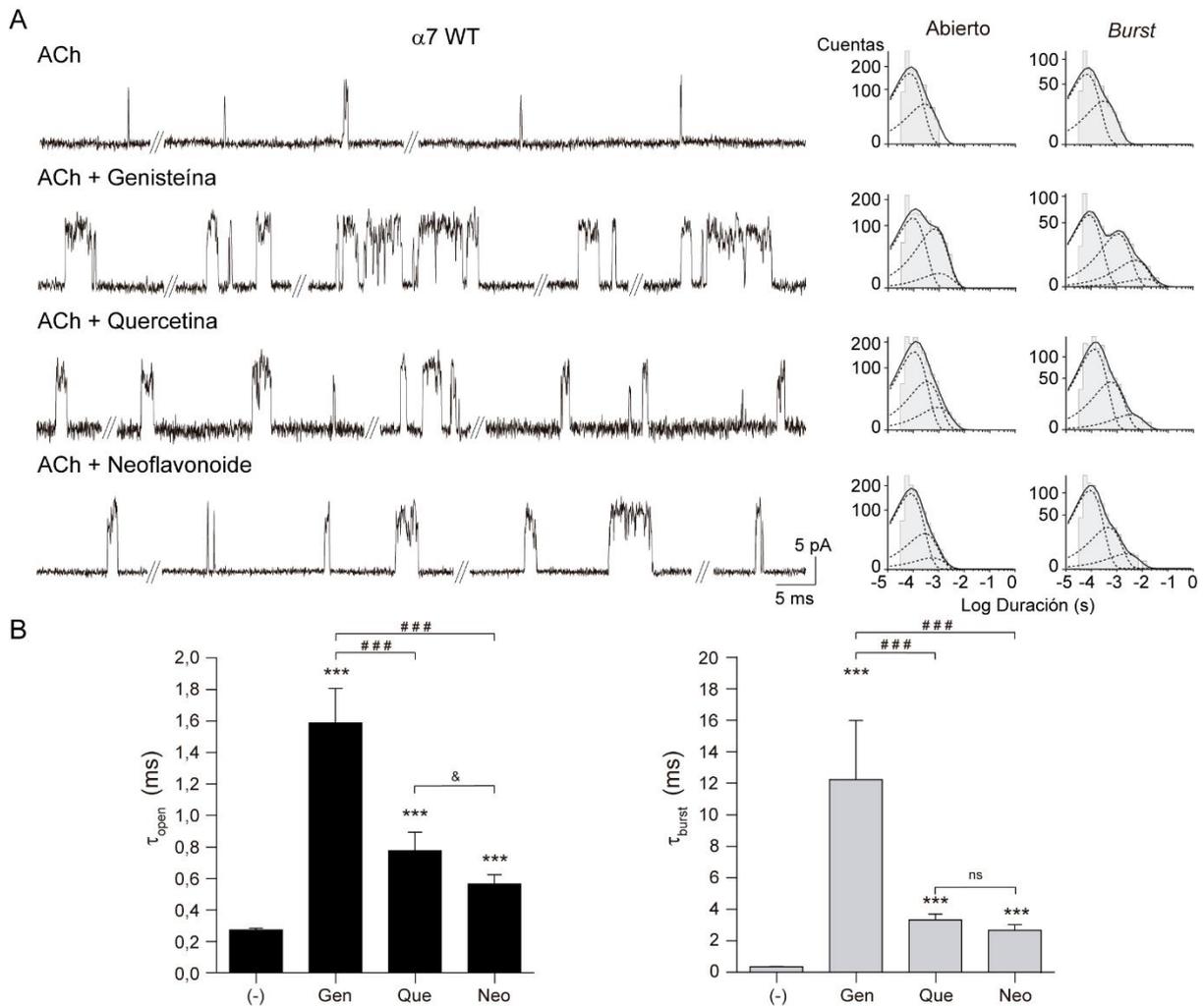


Figura I.II.4. Modulación alostérica por flavonoides sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. **A-** Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh 100 μ M en ausencia y en presencia de los distintos tipos de flavonoides a 50 μ M. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. **B-** Gráficos de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (izquierda, negro) y de *burst* (derecha, gris). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística respecto de la condición control fue evaluada por el test t-Student a dos colas (*). La significancia estadística entre flavonoides fue determinada por ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni (# y & indican diferencias significativas respecto de las condiciones Gen y Que respectivamente, ns indica que no hay diferencias significativas entre las condiciones).

A nivel de la **amplitud** de las corrientes unitarias, en presencia de ACh 100 μ M y 50 μ M de los flavonoides, el componente mayoritario de máxima amplitud fue $10,19 \pm 0,51$ pA para la Gen ($n = 5$, $N = 4$), $9,78 \pm 0,31$ pA para la Que ($n = 4$, $N = 3$) y $10,26 \pm 0,23$ pA para el Neo ($n = 4$, $N = 4$), no exhibiendo diferencias significativas con la amplitud totalmente resuelta del receptor $\alpha 7$ ($10,03 \pm 0,32$ pA, $n = 5$, $N = 5$, $p > 0,05$). Por lo tanto, los flavonoides, al igual que otros PAMs, no modificaron la conductancia

unitaria del receptor, sino que favorecieron la completa resolución de su amplitud al prolongar la duración de las aperturas y los *bursts*.

Receptor	Agonista	Flavonoide (μM)	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)	n	N	
$\alpha 7$	ACh 100 μM	-	$0,27 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02$	5	5	
		Gen	5	$1,10 \pm 0,05^{***}$	$3,21 \pm 0,26^{***}$	4	3
			10	$1,08 \pm 0,07^{***}$	$4,00 \pm 0,26^{***}$	4	3
			25	$1,62 \pm 0,04^{***}$	$13,62 \pm 3,53^{***}$	4	3
			50	$1,59 \pm 0,22^{***}$	$12,24 \pm 3,75^{***}$	5	4
			100	$1,54 \pm 0,17^{***}$	$10,92 \pm 0,97^{***}$	5	4
		Que	5	$0,24 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,06$	4	4
			10	$0,55 \pm 0,11^*$	$1,44 \pm 0,45^*$	4	4
			25	$0,76 \pm 0,25^{***}$	$2,89 \pm 1,12^{***}$	5	3
			50	$0,78 \pm 0,12^{***}$	$3,33 \pm 0,38^{***}$	4	3
			100	$0,76 \pm 0,04^{***}$	$2,81 \pm 0,44^*$	4	4
		Neo	5	$0,27 \pm 0,12$	$0,39 \pm 0,17$	4	3
			10	$0,25 \pm 0,10$	$1,11 \pm 0,15^*$	4	3
			25	$0,54 \pm 0,10^{***}$	$2,00 \pm 1,01^*$	4	4
			50	$0,57 \pm 0,06^{***}$	$2,66 \pm 0,37^{***}$	4	4
100	$0,39 \pm 0,13$		$1,36 \pm 0,71^*$	4	4		
$\alpha 7\text{-}5\text{HT}_3\text{A}$	ACh 500 μM	-	$5,26 \pm 0,30$	$12,35 \pm 3,00$	5	4	
		Gen	50	$2,32 \pm 0,34^{***}$	$6,06 \pm 1,89^{**}$	4	3
		Que	50	$4,54 \pm 1,00$	$10,36 \pm 2,08$	5	3
		Neo	50	$4,52 \pm 1,00$	$13,21 \pm 3,73$	4	3
$\alpha 7$ TSLMF	ACh 100 μM	-	$1,26 \pm 0,43$	$1,98 \pm 0,74$	5	4	
		Gen	50	$0,42 \pm 0,11^{**}$	$1,43 \pm 0,42$	5	4
		Que	50	$1,28 \pm 0,30$	$1,69 \pm 0,67$	4	3
		Neo	50	$0,77 \pm 0,04$	$1,51 \pm 0,47$	4	3

Tabla I.II.2. Modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7$, la quimera $\alpha 7\text{-}5\text{HT}_3\text{A}$ HC y el quintuple mutante $\alpha 7$ TSLMF por flavonoides a nivel de corrientes unitarias. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts* en presencia de agonista solo o combinado con los flavonoides para los distintos receptores. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control (*).

2. DETERMINANTES ESTRUCTURALES DE LA POTENCIACIÓN POR FLAVONOIDES

Con el objetivo de identificar los determinantes estructurales de la potenciación por los flavonoides se exploró inicialmente su efecto sobre el **receptor quimérico $\alpha 7\text{-}5\text{HT}_3\text{A}$ HC** (Bouzat *et al.*, 2004; Rayes *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 2016). Dado que se ha reportado que la Gen y la Que modulan negativamente al receptor 5-HT₃A (Goutman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005, 2008; Grønlien *et al.*, 2010), pero ejercieron el efecto contrario sobre el receptor $\alpha 7$, el uso de la quimera constituye una estrategia ideal para identificar los principales dominios del receptor involucrados en la potenciación. Por ello se realizaron registros de las corrientes unitarias del receptor quimérico por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 a un potencial de membrana de -70 mV. Las concentraciones utilizadas fueron 500 μM para ACh y 50 μM para los flavonoides (máximo efecto en receptor $\alpha 7$) (Figura I.II.5, Tabla I.II.2).

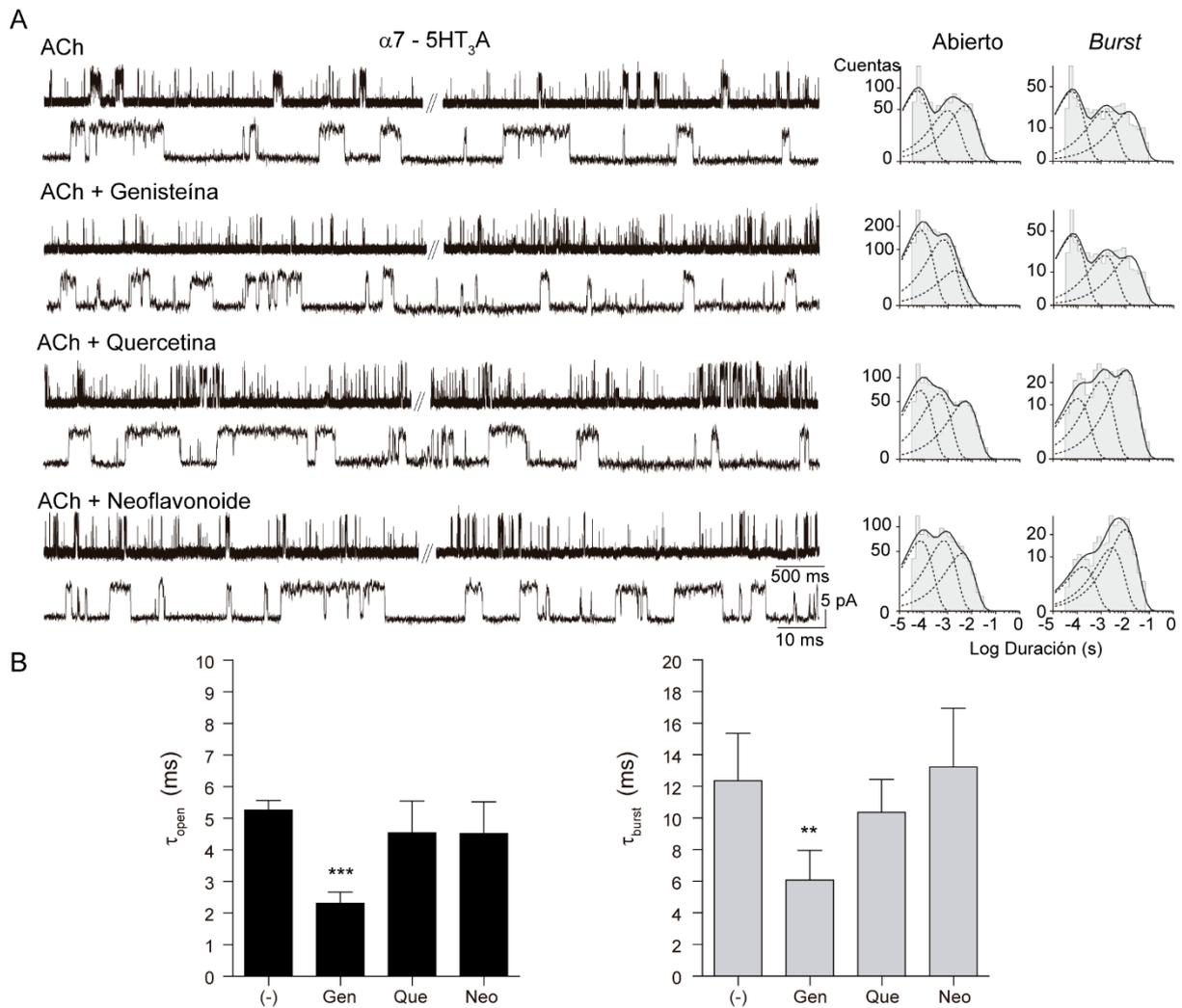


Figura I.II.5. Efecto de los flavonoides sobre el receptor quimérico $\alpha 7-5HT_3A$ a nivel de corrientes unitarias. A- Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7-5HT_3A$ activado por ACh 500 μM en ausencia y en presencia de los distintos tipos de flavonoides a 50 μM . Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. **B-** Gráficos de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (izquierda, negro) y de *burst* (derecha, gris). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística respecto de la condición control fue evaluada por el test t-Student a dos colas (*).

El receptor quimérico $\alpha 7-5HT_3A$ HC exhibe una cinética completamente diferente a la del receptor $\alpha 7$, como ha sido previamente caracterizada en detalle (Bouzat *et al.*, 2004; Rayes *et al.*, 2005). Al ser activado por ACh 500 μM , los registros de canal único mostraron aperturas de una duración media de ~ 5 ms, con numerosos episodios de activación de larga duración o *bursts*, cuya duración media fue de $\sim 12-15$ ms (Figura I.II.5, Tabla I.II.2). El $\tau_{crítico}$ quedó definido por la intersección entre los componentes segundo y tercero del histograma de estado cerrado ($\sim 2-5$ ms). Al coaplicar los flavonoides con la ACh, la Gen inhibió ligeramente las duraciones de las aperturas ($p < 0,001$) y de los *bursts* ($p < 0,01$), mientras que la Que y el Neo no afectaron las propiedades cinéticas del receptor $\alpha 7-5HT_3A$ HC ($p > 0,05$ en cada caso) (Figura I.II.5, Tabla I.II.2). En todas las condiciones, los histogramas de

estado abierto y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales cada uno, y no se observaron cambios en el $\tau_{\text{crítico}}$ (Figura I.II.5A). Por lo tanto, ninguno de los flavonoides actuó como PAM del receptor quimérico, sugiriendo un rol prominente del TMD o de la interfaz ECD-TMD de $\alpha 7$ en la potenciación ejercida por estos compuestos naturales.

Para ahondar aún más en los determinantes estructurales de potenciación de los flavonoides e identificar si los mismos se corresponden con los cinco residuos de la cavidad transmembrana propuesta como sitio de unión del PNU-120596, se utilizó el **receptor quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF** (Young *et al.*, 2008; DaCosta *et al.*, 2011). Las corrientes unitarias fueron registradas por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 a un potencial de membrana de -70 mV. Se utilizaron concentraciones de $100 \mu\text{M}$ para ACh y $50 \mu\text{M}$ para los flavonoides (máximo efecto en receptor $\alpha 7$) (Figura I.II.6, Tabla I.II.2).

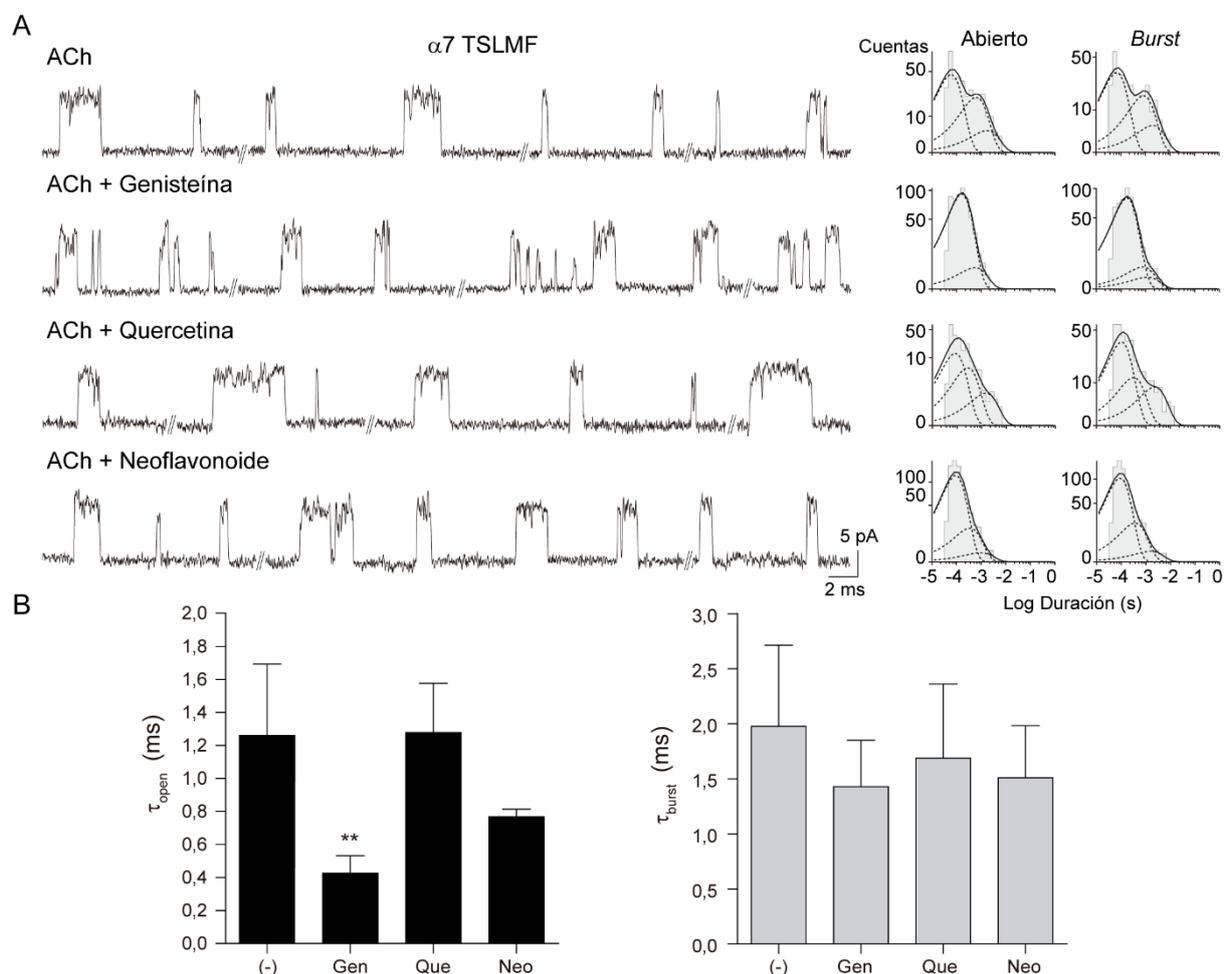


Figura I.II.6. Efecto de los flavonoides sobre el receptor quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF a nivel de corrientes unitarias. A- Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ TSLMF activado por ACh $100 \mu\text{M}$ en ausencia y en presencia de los distintos tipos de flavonoides a $50 \mu\text{M}$. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. B- Gráficos de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (izquierda, negro) y de *burst* (derecha, gris). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística respecto de la condición control fue evaluada por el test t-Student a dos colas (*).

Ninguno de los flavonoides potenció al receptor $\alpha 7$ TSLMF, particularmente la Que y el Neo no exhibieron efecto alguno ($p > 0,05$ para ambos a nivel de duración de aperturas y *bursts*), mientras que la Gen disminuyó significativamente la duración de las aperturas ($p < 0,01$) sin modificar la duración de los episodios de activación ($p > 0,05$). Los histogramas de estado abierto y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales en todos los casos, excepto en el de aperturas en presencia de la Gen, donde la inhibición se percibió a través de la desaparición del tercer componente y el consecuente ajuste únicamente con dos componentes exponenciales. El $\tau_{\text{crítico}}$ quedó definido por la intersección entre el segundo y el tercer componentes del histograma de estado cerrado, al igual que en ausencia de flavonoides ($\sim 1-4$ ms). Por lo tanto, los cinco residuos de la cavidad transmembrana o al menos algunos de ellos, resultaron esenciales para la potenciación mediada por los flavonoides.

Estos resultados revelaron que, pese a que los flavonoides se comportan como PAMs tipo I, comparten **determinantes estructurales de potenciación transmembrana** con el prototipo de PAM tipo II PNU-120596, semejando el comportamiento del PAM tipo I NS-1738, descrito en la parte I del presente capítulo de tesis.

3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES MEDIADA POR EL RECEPTOR $\alpha 7$

Dado que se han descrito ampliamente los efectos antioxidantes de los flavonoides, se decidió investigar si la potenciación que los mismos ejercen sobre el receptor $\alpha 7$ y su señalización tienen influencia en el rol neuroprotector de estos compuestos naturales. Con este objetivo, células BOSC23 que expresan heterológicamente el receptor $\alpha 7$ fueron expuestas a diferentes tratamientos (agonista, antagonista, flavonoides y combinaciones) por distintos tiempos (24 h y 12 h), para luego medir por fluorimetría los niveles intracelulares de ROS utilizando la sonda fluorescente DCFDA. Para la correcta cuantificación de los niveles de ROS se determinó la velocidad o la tasa de generación de ROS intracelulares por medición de la pendiente de la fluorescencia de DCF en función del tiempo, normalizándola a la pendiente de la condición control (Koopman *et al.*, 2006; Sepúlveda *et al.*, 2013). La linealidad en el incremento en la fluorescencia se mantuvo durante la medición cinética de 30 min, permitiendo el ajuste de las curvas por regresión lineal ($r^2 \sim 0,96-0,99$). En los ensayos se incorporaron controles de sonda y controles positivos con H_2O_2 1 mM para verificar el correcto funcionamiento de la sonda (Sepúlveda *et al.*, 2013; Bian *et al.*, 2015). Además, la fluorescencia de la DCF tras los tratamientos (tiempo inicial o 0 min de la medición cinética cuantitativa) fue observada por microscopia de fluorescencia (Metodología, pág. 63).

Como agonista se utilizó el PNU-282987, ya que es selectivo o específico para el receptor $\alpha 7$ (Hajos *et al.*, 2004; Bodnar *et al.*, 2005). La concentración seleccionada fue 10 μM porque ha sido extensamente empleada en estudios previos en distintos sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*, en los cuales se reportaron los efectos benéficos de la activación de $\alpha 7$ (Hu *et al.*, 2009; Parada *et al.*, 2010,

2013; Tsoyi *et al.*, 2011; Di Cesare Mannelli *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2015, 2016; Zanetti *et al.*, 2016). Si bien el receptor nicotínico $\alpha 7$ está transitoriamente sobreexpresado, las células BOSC23 también expresan de forma endógena receptores muscarínicos de ACh por ser derivadas de la línea celular HEK293 (Thomas y Smart, 2005). En los ensayos electrofisiológicos es posible utilizar la ACh como agonista porque la respuesta a nivel de corrientes es originada directamente por los receptores ionotrópicos (nAChRs), ya que no se ha reportado actividad de otros canales acoplados a los receptores muscarínicos en este sistema. En contraste, en los ensayos experimentales de medición de ROS donde la respuesta es a nivel de la señalización intracelular se utilizó el PNU-282987 en lugar de la ACh, para impedir que el efecto registrado se debiera a la activación conjunta de receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Aunque el PNU-282987 es altamente selectivo para $\alpha 7$, también se realizaron controles utilizando el antagonista específico α -Bgt (500 nM) para bloquear el efecto mediado por este receptor nicotínico. En estos casos se procedió realizando un paso previo de preincubación de las células por 2 h con α -Bgt para garantizar el bloqueo completo de $\alpha 7$, antes de los tratamientos con agonista y/o flavonoides en presencia del antagonista por los tiempos especificados.

Inicialmente los flavonoides fueron aplicados en concentración 50 μ M, a la cual se había observado la máxima actividad $\alpha 7$ -PAM, y los distintos tratamientos fueron realizados durante 24 h, para garantizar y compatibilizar los tiempos de activación de las vías de señalización intracelulares descritas tanto para $\alpha 7$ como para los flavonoides individualmente (Williams *et al.*, 2004; Parada *et al.*, 2010, 2013; Tsoyi *et al.*, 2011; Dajas-Bailador *et al.*, 2013; Qian *et al.*, 2015; Boadi *et al.*, 2016; Godoy *et al.*, 2017). Tras los **tratamientos de 24 h** y en consistencia con la capacidad antioxidante ampliamente descrita de los **flavonoides**, la generación de ROS intracelulares se redujo significativamente en las células expuestas a 50 μ M de Gen ($p < 0,001$, $n = 5$, $N = 5$), Que ($p < 0,001$, $n = 5$, $N = 5$) y Neo ($p < 0,001$, $n = 5$, $N = 5$) con respecto al control con DMSO ($n = 11$, $N = 11$) (Figura I.II.7B-C). En las presentes condiciones experimentales no hubo diferencias significativas en los niveles de ROS entre los tres flavonoides ($p > 0,05$).

Por su parte, la activación del receptor $\alpha 7$ por el **PNU-282987** 10 μ M también disminuyó los niveles de ROS intracelulares respecto de la condición control, aunque en menor medida que los flavonoides ($p < 0,001$, $n = 11$, $N = 11$) (Figura I.II.7B-C). Este accionar antioxidante ejercido por el PNU-282987 fue bloqueado completamente por el antagonista selectivo α -Bgt, verificando así que el efecto fue mediado específicamente por el receptor $\alpha 7$ ($p > 0,05$ respecto del control, $n = 9$, $N = 9$) (Figura I.II.7B-C). Como un control adicional se comprobó que la α -Bgt por sí sola no afectó la generación de ROS intracelulares ($p > 0,05$ respecto del control, $n = 9$, $N = 9$) (Figura I.II.7B-C).

Ante la **coaplicación del PNU-282987** 10 μ M con 50 μ M de los distintos **flavonoides**, la generación de ROS se redujo significativamente respecto de la condición control ($p < 0,001$, $n = 5$, $N = 5$ para las tres combinaciones: PNU + Gen, PNU + Que y PNU + Neo). El efecto antioxidante observado

en estas condiciones no exhibió diferencias significativas con las condiciones en presencia de los flavonoides solos ($p > 0,05$) (Figura I.II.7B-C).

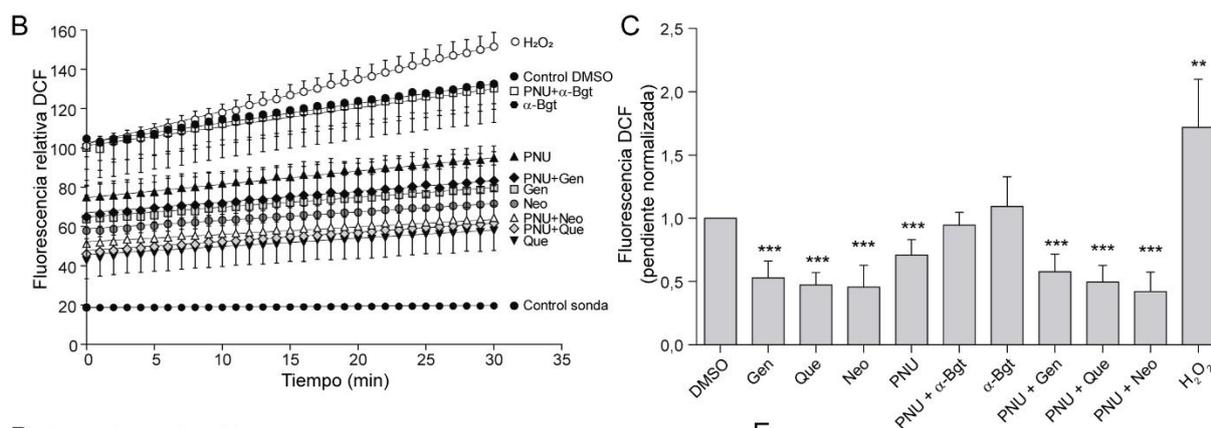
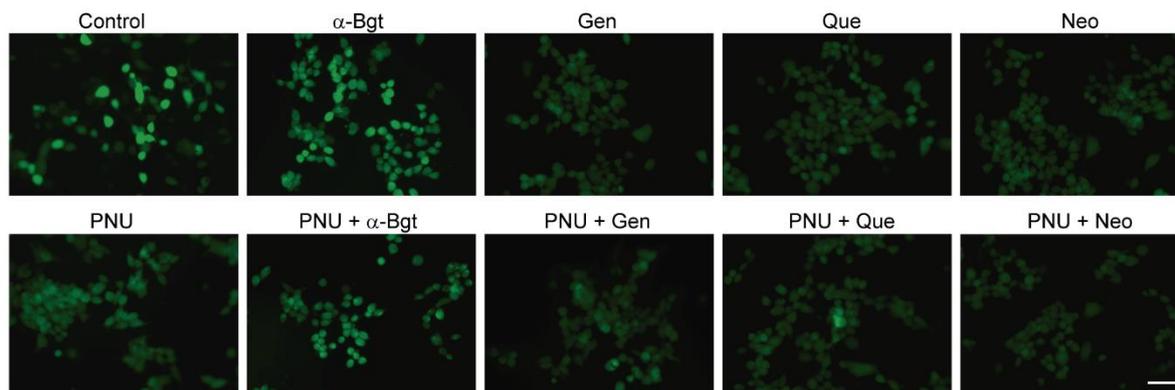
Todos los cambios en los niveles de ROS intracelulares determinados cuantitativamente por el ensayo cinético se reflejaron cualitativamente en la intensidad de la fluorescencia de DCF observada en las células de las distintas condiciones por microscopía de fluorescencia (Figura I.II.7A).

Dado que en la condición de coaplicación del PNU-282987 con los flavonoides se alcanzó el mismo nivel de antioxidación que el producido por los flavonoides individualmente, aun cuando el agonista produjo un efecto antioxidante *per se*, es probable que bajo estas condiciones experimentales se haya alcanzado la máxima reducción de ROS en el sistema, siendo imposible distinguir si coexisten mecanismos dependientes e independientes de $\alpha 7$. Por estas razones, con el objetivo de diferenciar la actividad $\alpha 7$ -PAM del elevado poder antioxidante de los flavonoides independientemente del receptor $\alpha 7$, se aplicaron dos estrategias: la reducción de la concentración de los flavonoides (de 50 μM a 10 μM) y la reducción del tiempo de exposición a los tratamientos (de 24 h a 12 h). Estos experimentos fueron llevados a cabo únicamente para la Gen, ya que es el flavonoide que exhibió mayor potencia y eficacia como PAM.

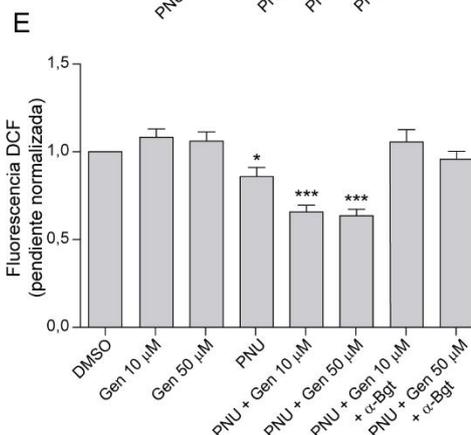
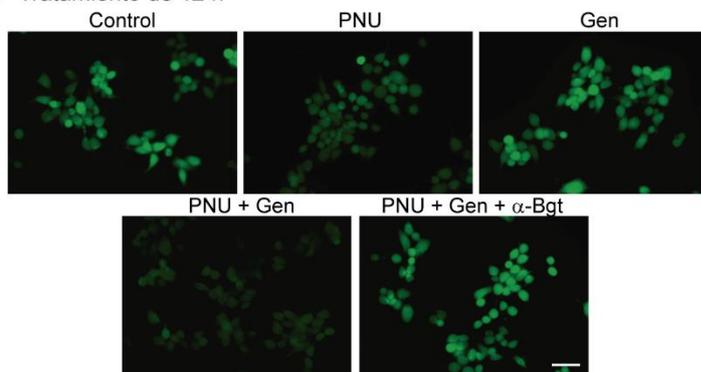
Al reducir la concentración de Gen a 10 μM en el tratamiento de 24 h se observó que dicho flavonoide aún conserva la capacidad de disminuir la generación de ROS respecto del control ($p < 0,001$, $n = 3$, $N = 3$). Sin embargo, la reducción observada (~20 %) fue inferior a la registrada por la Gen a 50 μM (~50 %) ($p < 0,05$), por lo tanto podemos decir que a 10 μM por 24 h el efecto antioxidante independiente de $\alpha 7$ fue submáximo. Luego al combinar Gen 10 μM con PNU-282987 10 μM se observó una disminución aún mayor en la tasa de producción de ROS con respecto al control ($p < 0,001$, $n = 3$, $N = 3$), siendo más pronunciada que la reducción ejercida individualmente por la Gen ($p < 0,01$) y el PNU-282987 ($p < 0,05$). Sin embargo, en el tratamiento de coaplicación nuevamente se alcanzó una tasa de producción de ROS similar a la obtenida en presencia de la Gen 50 μM sola o combinada con el agonista ($p > 0,05$). Esto sugiere que, bajo estas condiciones experimentales a 24 h, niveles similares de ROS intracelulares pueden ser alcanzados tanto por la actividad antioxidante de la Gen independiente de $\alpha 7$, como por la combinación de dicho efecto con el mediado a través del nAChR. Por estas razones se procedió a la aplicación de la segunda estrategia consistente en la reducción del tiempo de exposición a 12 h.

Con el **tratamiento durante 12 h**, la actividad antioxidante de la **Gen** *per se* no fue detectada a 10 μM ($n = 7$, $N = 7$) ni a 50 μM ($n = 7$, $N = 7$), ya que los niveles intracelulares de ROS no exhibieron diferencias significativas respecto a la condición control ($p > 0,05$ en cada caso) (Figura I.II.7E). Por el contrario, el **PNU-282987** 10 μM redujo significativamente la generación de ROS en comparación al control ($p < 0,05$, $n = 7$, $N = 7$), aunque dicha disminución fue menor que la observada a 24 h de tratamiento ($p < 0,05$) (Figura I.II.7E).

A Tratamiento de 24 h



D Tratamiento de 12 h

**Figura I.II.7. Efecto de los flavonoides en la generación de ROS intracelulares.**

Tratamiento de 24 h (A-C) A- Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia de los niveles de ROS tras los distintos tratamientos. Barra de escala: 50 μm. B- Gráfico de las curvas promedio que describen los niveles de ROS en las distintas condiciones en función del tiempo. También se presentan las curvas del control positivo con H₂O₂ y del control de sonda. Los datos se muestran como el promedio ± SEM, normalizando la pendiente de cada condición a la pendiente del control. C- Gráfico de barras de la tasa de generación de ROS (pendientes normalizadas) en las distintas condiciones obtenidas a partir del gráfico presentado en B. Los datos se muestran como el promedio ± SD. La significancia estadística respecto de la condición control fue evaluada por el test t-Student a dos colas (*). **Tratamiento de 12 h (D-E)** D- Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia tras los distintos tratamientos. Las condiciones que incluyen Gen se corresponden con la concentración 50 μM. Barra de escala: 50 μm. E- Gráfico de barras de la tasa de generación de ROS (pendientes normalizadas). Los datos se muestran como el promedio ± SD. La significancia estadística respecto de la condición control fue evaluada por el test t-Student a dos colas (*).

Por razones de claridad, en toda la figura se refiere al agonista PNU-282987 como PNU.

Llamativamente, la **coaplicación del PNU-282987** 10 μ M con **Gen** 10 μ M y 50 μ M produjo una reducción significativa en los niveles intracelulares de ROS respecto de la condición control ($p < 0,001$, $n = 7$, $N = 7$ para PNU + Gen 10 μ M y PNU + Gen 50 μ M) (Figura I.II.7E). Dicha disminución en ambos casos fue aún más pronunciada que la inducida por el agonista solo ($p < 0,01$ para PNU + Gen 10 μ M y PNU + Gen 50 μ M), demostrando así que la Gen incrementó o potenció el efecto antioxidante mediado por $\alpha 7$, actuando por ende a través de su actividad $\alpha 7$ -PAM tipo I. El accionar mediado por $\alpha 7$ se confirmó al ser bloqueado completamente por el antagonista selectivo α -Bgt, sin que se observaran diferencias con respecto a la condición control ($p > 0,05$, $n = 3$, $N = 3$ para PNU + Gen 10 μ M + α -Bgt y PNU + Gen 50 μ M + α -Bgt) (Figura I.II.7E).

Estos cambios en los niveles de ROS intracelulares determinados cuantitativamente por el ensayo cinético se correlacionaron con la fluorescencia de DCF observada cualitativamente en las células de las distintas condiciones por microscopía de fluorescencia (Figura I.II.7D).

En conclusión, la reducción en el tiempo de exposición a la Gen reveló que este flavonoide ejerció un accionar antioxidante mediado por el receptor $\alpha 7$ al potenciar su actividad como PAM tipo I, pero a una escala temporal distinta a la de sus mecanismos antioxidantes independientes de $\alpha 7$, que requirieron de tiempos de tratamiento aún mayores.

Discusión

A pesar de los efectos benéficos comunes en aprendizaje, memoria, cognición, antiinflamación y neuroprotección, el vínculo entre los flavonoides y el receptor nicotínico $\alpha 7$ ha sido pobremente explorado. Por esta razón, la presente parte del capítulo I se centró en el análisis de esa posible conexión entre los **flavonoides** y la **señalización colinérgica mediada por $\alpha 7$** , lo que permitió identificar y descifrar su **mecanismo molecular de acción**, el cual consiste en la **modulación alostérica positiva** de este receptor nicotínico. El efecto modulador de estos compuestos naturales fue abordado teniendo en cuenta la **respuesta dual ionotrópica/metabotrópica** del receptor $\alpha 7$, considerando por un lado las corrientes macroscópicas y unitarias, y por otro lado la actividad antioxidante dependiente de procesos de señalización intracelular.

Se estudiaron compuestos prototipo de las tres clases de flavonoides basadas en la diferente posición del anillo B sobre el esqueleto carbonado de benzopirano. La **Gen** (anillo B en posición 3) es una isoflavona abundante en la soja que mejora la memoria de corto y largo plazo, suprime vías inflamatorias y oxidativas, y al ser un fitoestrógeno, interviene en vías de señalización mediadas por el receptor de estrógeno (Spencer *et al.*, 2012; Ganai y Farooqi, 2015; Bakhtiari *et al.*, 2017). La **Que** (anillo B en posición 2) es un flavonol que constituye el flavonoide mayoritario de la ingesta dietaria y exhibe una importante actividad antiinflamatoria y antioxidante (Spencer *et al.*, 2012; Bakhtiari *et al.*, 2017). El **Neo** o **5,7-dihidroxi-4-fenilcumarina** (anillo B en posición 4) (Ulubelen *et al.*, 1982) forma parte de los neoflavonoides, la clase de flavonoides menos explorada por su limitada distribución taxonómica en plantas superiores, aunque su estructura y popularidad en la medicina tradicional los ha convertido en compuestos atractivos desde el punto de vista farmacológico. En particular, el Neo fue descrito como agente inhibidor de fosfodiesterasas (Kusano *et al.*, 1991), antioxidante (Veselinović *et al.*, 2014), antibacteriano (Veselinović *et al.*, 2015) y antimelanogénico (Veselinović *et al.*, 2017).

La **caracterización farmacológica** de los flavonoides a nivel electrofisiológico evidenció que los compuestos prototipo de las tres clases de flavonoides (Gen, Que y Neo) actúan como **PAMs tipo I** del receptor $\alpha 7$, ya que incrementaron el pico de las **corrientes macroscópicas** evocadas por el agonista, sin afectar significativamente su decaimiento o velocidad de desensibilización, y sin producir reactivación de los receptores desensibilizados. A nivel de las **corrientes unitarias**, los flavonoides modificaron la cinética del receptor $\alpha 7$ incrementando el tiempo de estado abierto del canal por prolongación de las aperturas individuales e induciendo la activación en *bursts* compuestos por varias aperturas rápidas y sucesivas, como se demostró previamente para otros PAMs tipo I (parte I del presente capítulo de tesis, (Andersen *et al.*, 2016)).

Si bien los tres flavonoides descritos actuaron como PAMs tipo I del receptor $\alpha 7$ independientemente de su clase, exhibieron diferencias en la potencia y la eficacia de su efecto farmacológico. Evidentemente la posición del anillo B sobre la estructura carbonada de benzopirano no modifica el mecanismo de acción principal por el cual los flavonoides actúan sobre $\alpha 7$, pero podría estar involucrado, junto con otros aspectos estructurales como el patrón de hidroxilación, en las diferencias de potencia y eficacia observadas. Además, todos los compuestos evaluados poseen grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7 del anillo A, los cuales fueron previamente reportados como condición necesaria en la estructura del flavonoide para ejercer neuroprotección (Echeverry *et al.*, 2010; Dajas-Bailador *et al.*, 2013). En concordancia, en la presente parte del capítulo I se demostró que la actividad α -PAM constituye un mecanismo molecular adicional y novedoso por el cual los flavonoides ejercerían su rol neuroprotector.

En términos de **potencia**, la Gen y el Neo resultaron los flavonoides más potentes por encima de la Que. Respecto de la **eficacia**, la Gen fue el flavonoide más eficaz, considerando como respuesta el incremento del pico de corriente macroscópica o las duraciones de aperturas y *bursts* de las corrientes unitarias. La Gen, la Que y el Neo incrementaron en ~ 6 , ~ 3 y ~ 2 veces la duración de las aperturas, y en ~ 35 , ~ 10 y ~ 8 veces la duración de los episodios de activación en *bursts* respectivamente. Si bien entre los tres flavonoides existe una correlación en el orden de eficacia determinado por corrientes macroscópicas y unitarias, al compararlos con los prototipos de PAMs tipo I, como el 5-HI y el NS-1738 descritos en la parte I del presente capítulo, se observa nuevamente una falta de concordancia entre los cambios detectados a ambos niveles. Por ejemplo, al considerar la potenciación a nivel macroscópico, el efecto de la Gen fue similar al producido por el NS-1738 y menor al ejercido por el 5-HI, el cual resultó ser aproximadamente el doble. Sin embargo, al considerar la potenciación a nivel microscópico, la Gen incrementó la duración de las aperturas de forma similar al 5-HI (~ 6 -8 veces), y potenció notoriamente la duración de los *bursts*, en mayor medida que el prototipo de PAM tipo I (~ 35 veces $>$ ~ 15 veces). El comportamiento de la Gen fue semejante al del NS-1738, cuya potenciación en comparación al 5-HI es inferior a nivel macroscópico, pero considerablemente mayor a nivel microscópico si se considera la duración de los episodios de activación sostenidos (~ 50 veces). En este contexto y posicionando a los flavonoides junto a los PAMs prototipo ya descritos, el orden de eficacia según las corrientes macroscópicas sería: PNU-120596 $>$ 5-HI $>$ NS-1738 \geq Gen $>$ Que \geq Neo, mientras que según las corrientes unitarias sería: PNU-120596 $>$ NS-17378 \geq Gen \geq 5-HI $>$ Que \geq Neo. La duración de los episodios de activación, en este caso de los *bursts*, parece ser el parámetro cinético más sensible para evaluar el efecto potenciador de los PAMs, complejizando el panorama de los mecanismos moleculares de modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7$ homomérico y, nuevamente resaltando la importancia de complementar el análisis macroscópico con el microscópico.

El efecto potenciador del neoflavonoide sobre el receptor nicotínico $\alpha 7$ fue descrito por primera vez en la presente parte del capítulo II, mientras que ya existían algunos reportes previos sugiriendo este accionar para la Gen (Grønlien *et al.*, 2007, 2010) y la Que (Lee *et al.*, 2010, 2016). En contraste con uno de estos estudios donde se requirió necesariamente de un paso de preincubación con el flavonoide (Lee *et al.*, 2010), en los resultados aquí expuestos el máximo nivel de potenciación fue alcanzado por aplicación simultánea de los flavonoides y el agonista (protocolo de coaplicación). Esta diferencia puede deberse a los distintos sistemas de perfusión y a la velocidad de intercambio de soluciones utilizados en cada caso para los registros electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus*, ya que los datos que aquí se presentan fueron obtenidos por TEVC automatizado en lugar de por la técnica manual.

Dado que la Gen y la Que son también inhibidores de tirosina quinasas (Glossmann *et al.*, 1981; Akiyama *et al.*, 1987), los cambios que provocan en el estado de fosforilación del receptor $\alpha 7$ (residuos tirosinas del ICD) podrían afectar su función y/o nivel de expresión, incrementando las corrientes macroscópicas. Inicialmente, los reportes sobre el efecto de la Gen fueron controversiales e inconclusos, puesto que mientras un estudio postuló un aumento en la expresión del receptor $\alpha 7$ en membrana que no pudo reproducirse utilizando otros inhibidores de quinasas (Cho *et al.*, 2005); otro estudio no detectó cambios en el nivel de expresión, proponiendo un aumento de la funcionalidad del receptor que sí pudo reproducirse utilizando otros inhibidores de quinasas (Charpantier *et al.*, 2005). Sin embargo, los efectos moduladores de numerosos flavonoides sobre distintos pLGICs, como receptores de GABA_A y Gly, e inclusive nAChRs, han sido descritos como independientes de la inhibición de las tirosina quinasas, por la rápida velocidad de acción a la que ocurren (tiempo insuficiente para producir la inhibición de las enzimas), la rápida reversibilidad, y la incapacidad para ser reproducidos empleando al menos cuatro inhibidores de tirosinas quinasas diferentes (Huang *et al.*, 1999; Huang y Dillon, 2000; Goutman *et al.*, 2003; Grønlien *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). Incluso el efecto potenciador de la Que se mantiene intacto en un receptor $\alpha 7$ cuyas tirosinas del ICD fueron mutadas a alaninas, eliminando los posibles sitios de fosforilación (Lee *et al.*, 2010).

Por los resultados aquí expuestos se sustenta un efecto directo de modulación alostérica positiva como mecanismo de acción de los flavonoides sobre el receptor $\alpha 7$, ya que tanto los flavonoides con actividad inhibidora de tirosina quinasas (Gen y Que) como el Neo que carece de dicha capacidad produjeron la potenciación de forma rápida y reversible por coaplicación, e incluso no potenciaron o inhibieron al receptor $\alpha 7$ TSLMF, el cual porta mutaciones en determinantes estructurales de la actividad $\alpha 7$ -PAM pero manteniendo intactas las tirosinas que son sitio de fosforilación. Si bien es factible que cambios en la fosforilación del receptor modifiquen su nivel de expresión y/o funcionalidad, el uso de la Gen o la Que como inhibidores de tirosina quinasas para evidenciarlos no resulta apropiado, porque dichos flavonoides ejercen también su efecto PAM a

distinta escala temporal, más rápidamente, en el orden de los milisegundos-segundos; y esto podría explicar la existencia de resultados previos controversiales y opuestos sobre el accionar de la Gen y de otros inhibidores de quinasas sobre el receptor $\alpha 7$.

Habiendo clasificado a los flavonoides como PAMs tipo I y siendo estos los más controversiales en términos de sus posibles sitios de unión en el receptor $\alpha 7$, se analizaron sus **determinantes estructurales de potenciación** empleando el **receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A HC** y el **receptor quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF**. La quimera no fue potenciada por ninguno de los flavonoides evaluados, pese a ser modulada positivamente por los PAMs tipo I 5-HI y NS-1738 (Grønlien *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2011b; Andersen *et al.*, 2016), sugiriendo un posible rol determinante de la interfaz ECD-TMD o del TMD del receptor $\alpha 7$. Utilizando el receptor quíntuple mutante, el cual tampoco fue potenciado por los tres flavonoides evaluados, se verificó la clara influencia de los residuos de la cavidad transmembrana como determinantes estructurales de la potenciación por flavonoides. Tal como fue descrito previamente, este receptor $\alpha 7$ TSLMF afecta en distinto grado a la potenciación ejercida por los diferentes tipos de PAMs, ya que el PAM tipo II PNU-120596 pierde la capacidad de potenciarlo al igual que algunos PAMs tipo I como el NS-1738, mientras que otros PAMs tipo I como el 5-HI logran mantener su actividad potenciadora (parte I capítulo I de la presente tesis, (DaCosta *et al.*, 2011; Andersen *et al.*, 2016)).

Cabe destacar que la Gen no sólo no potenció al receptor quimérico ni al quíntuple mutante, sino que inhibió a los mismos reduciendo la duración de las aperturas y los *bursts* en el primer caso, y la duración de las aperturas en el segundo caso, es decir, actuó como un NAM para $\alpha 7$ -5HT₃A HC y $\alpha 7$ TSLMF. Este resultado se encuentra en concordancia con reportes previos que muestran cómo los ligandos alostéricos pueden cambiar su perfil farmacológico de acción ante mutaciones puntuales en los residuos determinantes de su actividad, con posibilidad de interconvertirse entre PAMs, NAMs, SAMs y agonistas alostéricos (Bertrand *et al.*, 2008; Collins y Millar, 2010; Grønlien *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2011; Chatzidaki *et al.*, 2015; Newcombe *et al.*, 2018). Un ejemplo análogo a lo observado para la Gen, donde un PAM se convierte en inhibidor en un receptor $\alpha 7$ mutado, ocurre con el PAM tipo I IVM, al cual ciertas mutaciones en la región transmembrana (S223M, M254L y S277V) logran transformarlo en NAM (Collins y Millar, 2010). Es más, la Gen se comportó de manera muy similar a la IVM, ya que ambos PAMs tipo I no potencian al receptor quimérico (Bertrand *et al.*, 2008; Collins y Millar, 2010; Grønlien *et al.*, 2010), y el receptor quíntuple mutante que la Gen inhibió presenta dos de las mutaciones (S223M y M254L) que tornan NAM a la IVM. Por su parte, la Que y el Neo no potenciaron ni inhibieron al receptor $\alpha 7$ TSLMF, lo cual podría deberse a diversas razones: los flavonoides se convirtieron en SAMs, se inhabilitó el sitio de unión al receptor o se alteró la transducción de la señal y los cambios conformacionales asociados que median la potenciación. Por lo

tanto, los tres flavonoides actúan como PAMs sobre $\alpha 7$, pero las mutaciones en los determinantes estructurales de potenciación a nivel transmembrana los afectan de dos maneras: por un lado, igualmente, en términos del cese de su efecto potenciador y, por otro lado, diferencialmente, convirtiéndolos o no en inhibidores. Esto último podría tener origen en las distintas interacciones que cada compuesto establece con los residuos del receptor gracias a sus particularidades estructurales.

En resumen, los resultados expuestos en la parte II del presente capítulo demostraron que los flavonoides actúan como PAMs tipo I del receptor $\alpha 7$, pues exhiben perfiles de corrientes macroscópicas y unitarias compatibles con su clasificación, pero comparten determinantes estructurales de potenciación transmembrana característicos de los PAMs tipo II, semejando el comportamiento de ciertos PAMs tipo I, como el NS-1738 descrito en la parte I y la IVM. Incluso la influencia de los residuos transmembrana para la potenciación por el NS-1738 y la Gen había sido reportada previamente sin saberlo (Bertrand *et al.*, 2008; Grønlien *et al.*, 2010), puesto que se había detectado al *loop* M2-M3 como determinante, y tras el refinamiento del modelo estructural de $\alpha 7$ se percibió que esos residuos en realidad formaban parte del M2 a nivel transmembrana, y que habían sido erróneamente localizados en la interfaz ECD-TMD. Así, nuevamente se provee información respecto de la complejidad de la modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7$, incorporando en el panorama a estos compuestos de origen natural cuyo comportamiento contribuye a confirmar que los prototipos de PAMs tipo I (5-HI) y tipo II (PNU-120596) tal vez constituyan los extremos de un vasto rango de moduladores alostéricos. Por lo tanto, como esta clasificación simplifica y reduce la diversidad de moduladores a sólo dos categorías basándose en las observaciones macroscópicas, se resalta la importancia de caracterizar también los mecanismos de acción a nivel molecular o de canal único.

Dado que el accionar de los flavonoides como PAMs tipo I fue verificado fehacientemente desde el punto de vista de la respuesta ionotrópica del receptor $\alpha 7$, se decidió explorar la potencial incidencia de este efecto sobre la **respuesta metabotrópica**, a través de la evaluación de la **actividad antioxidante**. Esta ha sido descrita, tanto en los flavonoides como en la señalización colinérgica mediada por $\alpha 7$, como uno de los principales mecanismos por los cuales modulan la inflamación y promueven la neuroprotección frente a los desórdenes neurodegenerativos.

Al exponer las células a los tratamientos de 24 h se observó que la activación de $\alpha 7$ por el agonista selectivo PNU-282987 disminuyó la tasa de generación de ROS intracelulares, en línea con los reportes previos sobre los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de $\alpha 7$ en diferentes sistemas (Parada *et al.*, 2010, 2013; Tsoyi *et al.*, 2011). Por su parte, la coaplicación de los distintos flavonoides con el PNU-282987 redujo los niveles de ROS intracelulares en mayor medida, pero alcanzando el mismo grado de antioxidación que los flavonoides solos por vías independientes de $\alpha 7$ a la

concentración de máximo efecto. Aun disminuyendo los flavonoides a una concentración submáxima, al combinarse con el agonista se alcanzó el mismo nivel de disminución de ROS. Esto sugirió que bajo estas condiciones experimentales a 24 h se había alcanzado la máxima reducción posible de ROS en el sistema, no pudiendo distinguir entre los mecanismos dependientes e independientes de $\alpha 7$ que coexistirían en la condición de coaplicación, principalmente por el marcado predominio del efecto antioxidante *per se* de los flavonoides que enmascara el accionar mediado por receptor.

En consecuencia, utilizando la Gen, que posee la mayor potencia y eficacia como $\alpha 7$ -PAM, y reduciendo el tiempo de exposición a 12 h, fue posible diferenciar la actividad del flavonoide mediada por el receptor $\alpha 7$ de su poder antioxidante independiente del mismo. Si bien a las 12 h este efecto *per se* del flavonoide no se evidenció, demostrando que requiere de un tiempo mayor para manifestarse, la activación del receptor $\alpha 7$ por el PNU-282987 sí disminuyó los niveles de ROS intracelulares de forma significativa. En estas condiciones experimentales, la coaplicación del agonista específico con la Gen redujo la generación de ROS aún más que el agonista individualmente, y dado que el flavonoide por sí solo no exhibió efecto, claramente actuó potenciando al receptor $\alpha 7$ y a su respuesta antioxidante. Por consiguiente, la actividad de los flavonoides como PAMs tipo I del receptor $\alpha 7$ homomérico constituye un mecanismo adicional por el cual estos compuestos naturales ejercen su acción antioxidante, la cual tendría lugar más tempranamente que los otros mecanismos ya descriptos. Cabe destacar que el efecto antioxidante mediado por $\alpha 7$ en este sistema experimental sólo se produce en las células transfectadas que expresan heterológicamente el receptor, mientras que el efecto antioxidante de los flavonoides *per se* o independiente de $\alpha 7$ ocurre por diversas vías de señalización intracelular presentes tanto en células transfectadas como no transfectadas. Por lo tanto, es probable que las diferencias entre ambas condiciones estén subestimadas, y que la contribución de la señalización por $\alpha 7$ en la reducción de los niveles de ROS intracelulares sea aún mayor. Aun así, el hecho de que la disminución en los niveles de ROS por activación de $\alpha 7$ sea significativa, sustenta el uso de este sistema de expresión heteróloga como modelo para la medición de los efectos mediados por el nAChR.

Como se ha descrito previamente, el receptor $\alpha 7$ presenta una actividad dual ionotrópica/metabotrópica responsable de su rol en la neuroprotección. El incremento transitorio en los niveles de Ca^{+2} por los iones que ingresan a través del canal (actividad ionotrópica) se convierte en un evento sostenido por la liberación de más Ca^{+2} desde los reservorios intracelulares, y junto con la interacción directa del receptor con proteínas citoplasmáticas, activan vías de señalización intracelulares (actividad metabotrópica) (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Egea *et al.*, 2015; Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat *et al.*, 2018; Kabbani y Nichols, 2018) (Introducción, págs. 28-29, Fig. 12). El efecto neuroprotector de $\alpha 7$ depende de la inhibición del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B, y de la activación de la vía JAK2/PI3K/Akt, que a su vez activa al factor de transcripción Nrf-2,

primariamente responsable de la transcripción de genes asociados a la defensa celular frente al estrés oxidativo como la HO-1 (Tsoyi *et al.*, 2011; Parada *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2015). De hecho, uno de los mecanismos propuestos para explicar los efectos antioxidantes y antiinflamatorios del receptor $\alpha 7$ se basa en el incremento de los niveles de Ca^{+2} intracelular, que activarían la PKC y finalmente a PI3K/Akt, estimulando a Nrf-2 e induciendo la expresión de HO-1 para disminuir la generación de ROS intracelulares (Tsoyi *et al.*, 2011). Por su parte, la elevada capacidad antioxidante de los flavonoides ha sido objeto de gran interés, habiéndose identificado mecanismos directos e indirectos (captura de radicales libres, inhibición de enzimas, etc.) y otros que involucran la modulación de diversas vías de señalización intracelulares, factores de transcripción y expresión de genes (Williams *et al.*, 2004; Ebrahimi y Schluesener, 2012; Spencer *et al.*, 2012; Dajas-Bailador *et al.*, 2013; Vauzour *et al.*, 2015; Bakhtiari *et al.*, 2017; Flanagan *et al.*, 2018; Bakoyiannis *et al.*, 2019). Ciertos estudios habían sugerido a estos últimos mecanismos como los principales responsables de los efectos benéficos observados *in vivo*, dado que las concentraciones y la vida media de los flavonoides en un organismo son considerablemente menores a las requeridas para su actividad antioxidante directa e indirecta (Williams *et al.*, 2004; Spencer *et al.*, 2012; Dajas-Bailador *et al.*, 2013; Flanagan *et al.*, 2018). Aunque no se hayan dilucidado por completo la totalidad de estos mecanismos, entre las numerosas cascadas de señalización intracelular involucradas se encuentra la inhibición de NF- κ B, y la activación de PI3K/Akt con inducción de la expresión de Nrf-2 y la consecuente protección frente al estrés oxidativo (Williams *et al.*, 2004; Dajas-Bailador *et al.*, 2013). Coincidentemente, estas vías son las que han sido principalmente descriptas en la señalización por $\alpha 7$.

Los resultados expuestos en esta parte del presente capítulo evidenciaron que la **modulación alostérica positiva de los flavonoides sobre el receptor $\alpha 7$ homomérico** constituye un **mecanismo adicional** por el cual estos compuestos naturales ejercen sus **efectos antioxidantes**, y, por lo tanto, su **rol neuroprotector**. En presencia de estos PAMs tipo I la activación de $\alpha 7$ resulta más sostenida, con un mayor influjo de Ca^{+2} y, en consecuencia, también se potencian las vías intracelulares de señalización acopladas que conducen a la antioxidación. Aunque los flavonoides ejerzan antioxidación por otros mecanismos independientes de $\alpha 7$, estos requieren de mayor concentración y mayor tiempo para manifestarse, razones por las cuales probablemente predominaron en los experimentos tras 24 h de tratamiento, alcanzándose la máxima reducción en los niveles de ROS del sistema. Al disminuir la concentración y el tiempo de tratamiento, sólo se continuó observando el efecto antioxidante mediado por $\alpha 7$ y su potenciación; y aunque existan vías de señalización comunes entre las dependientes del receptor y las promovidas por los flavonoides independientemente del mismo, claramente la activación ocurre a distinta escala temporal, pues se desencadenan más rápidamente a través de la actividad dual ionotrópica/metabotrópica del receptor $\alpha 7$.

Respecto del potencial **impacto terapéutico de los flavonoides** como compuestos naturales con actividad $\alpha 7$ -PAM es preciso considerar varios aspectos. En cuanto a la **selectividad**, únicamente se ha reportado el efecto modulador positivo de los flavonoides sobre el receptor $\alpha 7$, mientras que numerosos estudios previos demostraron un accionar inhibitorio sobre la mayoría de los otros receptores de NT como GABA, 5-HT, ACh, Gly, Glu, etc. (Huang *et al.*, 1999; Huang y Dillon, 2000; Goutman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005, 2007, 2008; Grønlien *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2010; Lee, Choi, *et al.*, 2011; Lee, Hwang, *et al.*, 2011; Lee, Shin, *et al.*, 2011). Por lo tanto, la estricta selectividad de su actividad PAM sobre $\alpha 7$ resulta una característica prometedora desde el punto de vista clínico, ya que disminuiría los efectos adversos.

Otro punto a favor es la **gran diversidad estructural**, tanto de los compuestos naturalmente disponibles en las plantas, como de aquellos que puedan sintetizarse empleando a los flavonoides naturales como base o plataforma para el diseño de nuevos fármacos. Para los receptores de GABA existen reportes sobre cómo pequeñas modificaciones químicas en la estructura de los flavonoides (cambios en el patrón de hidroxilación o de sustituyentes) derivan en diferentes efectos farmacológicos, ya sean positivos, negativos o silentes (Hanrahan *et al.*, 2011; Wasowski y Marder, 2012). Esto demuestra que no sólo los flavonoides naturales, sino también los sintéticos, exhiben un elevado potencial para su uso terapéutico.

Al igual que otros PAMs, los flavonoides también exhiben las ventajas propias de los moduladores alostéricos, como el mantenimiento del patrón temporal y espacial de secreción del agonista endógeno y el menor desarrollo de tolerancia/dependencia (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Faghieh *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2011b; Uteshev, 2014; Chatzidaki y Millar, 2015; Bouzat *et al.*, 2018). Además, al ser PAMs tipo I, la potenciación es más modesta, no reactivan receptores desensibilizados y no disminuyen la velocidad de desensibilización, por lo tanto, se mantiene intacto el mecanismo protector o de defensa ante la estimulación excesiva, **minimizando el riesgo de citotoxicidad** en relación a los PAMs tipo II (Ng *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2012; Guerra-Álvarez *et al.*, 2015).

El potencial uso terapéutico de los flavonoides de **origen dietario** también presenta varias aristas a considerar. Aunque diversos estudios epidemiológicos y ensayos clínicos demostraron fehacientemente la existencia de una correlación entre el consumo dietario de flavonoides con el mejoramiento cognitivo y un menor riesgo de demencia (Commenges *et al.*, 2000; Letenneur *et al.*, 2007; Nurk *et al.*, 2009; Bakhtiari *et al.*, 2017), las propiedades fisicoquímicas de los flavonoides no son las óptimas para una droga de uso terapéutico, por lo tanto, resulta indispensable resolver los desafíos asociados a su estabilidad y biodisponibilidad. Tras su ingestión, los flavonoides experimentan una serie de procesos de biotransformación y conjugación durante su paso por el tracto gastrointestinal, el hígado y las células blanco, siendo sustrato de enzimas de fase I y II (Corcoran *et al.*, 2012; Del Rio

et al., 2013; Jaeger *et al.*, 2018). En los ensayos experimentales llevados a cabo en la presente parte del capítulo I se utilizaron los flavonoides en su forma no metabolizada, pero tras su ingestión, una gran proporción de estos son desglicosilados y metabolizados por reacciones de glucuronidación, sulfatación y/o metilación. Existen controversias respecto a si las formas biotransformadas de los flavonoides continúan reteniendo su actividad biológica, particularmente en este caso su actividad $\alpha 7$ -PAM, por lo que serán necesarios futuros estudios empleando las formas metabolizadas de estos compuestos naturales. Sin embargo, diversos reportes han demostrado que las formas derivadas y conjugadas de varios compuestos polifenólicos exhiben la misma actividad biológica o incluso mayor a la de la especie química original, e interaccionan por las mismas vías de señalización (Monagas *et al.*, 2010; Unno *et al.*, 2017; Kawai, 2018). En favor de esto se puede mencionar el caso de la Que, donde la forma glicosilada mayoritaria en plantas carece actividad potenciadora sobre $\alpha 7$, mientras que la forma desglicosilada tras la ingestión es activa como PAM (Lee *et al.*, 2016). Aunque la ingesta dietaria o los suplementos orales de flavonoides podrían constituir una terapia alternativa natural para los desórdenes neurodegenerativos, también se está intentando incrementar la eficiencia terapéutica mediante el desarrollo de nuevos sistemas y vías de administración para los flavonoides no metabolizados, de modo que se impidan los procesos de biotransformación y se incremente el paso a través de la barrera hematoencefálica, como por ejemplo con nanopartículas y liposomas (Bagli *et al.*, 2016).

La **ingesta diaria** de flavonoides varía entre 60-350 mg por día (Johnston, 2015; Sebastian *et al.*, 2015), alcanzando concentraciones *in vivo* en el rango nanomolar alto-micromolar bajo, que se correlacionan con las concentraciones efectivas o funcionales *in vitro* (Schaffer y Halliwell, 2012; Vauzour, 2012; Wang *et al.*, 2012; Krasieva *et al.*, 2015). Llamativamente, algunos compuestos polifenólicos y/o sus metabolitos tras atravesar la barrera hematoencefálica son retenidos y concentrados en el tejido nervioso, alcanzando niveles aún mayores a los del plasma sanguíneo (Kalt *et al.*, 2008; Milbury y Kalt, 2010). Los resultados aquí expuestos evidenciaron que la actividad $\alpha 7$ -PAM de los flavonoides se empezó a manifestar en concentraciones de 5-10-25 μM , correspondientes al rango micromolar bajo, es decir, compatibles con concentraciones fisiológicas o clínicamente alcanzables. Más aún, es factible que las acciones benéficas de estos compuestos naturales también dependan del efecto sinérgico y/o aditivo de los múltiples flavonoides ingeridos a través de la dieta.

En síntesis, por un lado, el **receptor nicotínico $\alpha 7$ homomérico** ejerce un rol clave en cognición, memoria, neuroprotección y regulación de la inflamación, emergiendo la **modulación alostérica positiva** como una **estrategia terapéutica** promisoría para los desórdenes neurológicos e inflamatorios. Por otro lado, los **flavonoides** constituyen un grupo de compuestos polifenólicos naturales con acciones procognitivas, neuroprotectoras, y antiinflamatorias ampliamente

documentadas, no sólo a través de su accionar antioxidante directo-indirecto, sino también modulando la actividad de proteínas de distintas vías de señalización intracelulares y receptores de NT. Los resultados aquí expuestos revelaron y esclarecieron **el vínculo o conexión entre los efectos benéficos comunes de $\alpha 7$ y los flavonoides**, actuando estos últimos como **PAMs tipo I** del receptor. Se descifraron los mecanismos moleculares de la actividad $\alpha 7$ -PAM de las tres clases de flavonoides, incluyendo un neoflavonoide cuyo efecto a nivel biológico fue por primera vez descrito. Los tres flavonoides potencian las corrientes macroscópicas sin modificar la velocidad de desensibilización ni reactivar receptores desensibilizados, incrementan el tiempo de estado abierto del canal iónico e inducen su activación en episodios sostenidos de aperturas sucesivas denominados *bursts*, modulando así la cinética de las corrientes unitarias. Además, la actividad potenciadora está determinada por residuos del receptor a nivel transmembrana, compartidos con otros PAMs no relacionados estructuralmente; y se manifiesta tanto en la respuesta ionotrópica del canal como en la metabotrópica, mediante la cual disminuye los ROS intracelulares.

Es así que la modulación alostérica positiva de $\alpha 7$ por los flavonoides queda establecida entonces como un mecanismo de acción adicional subyacente al rol neuroprotector de estos compuestos naturales, los cuales, además de ser promisorios a nivel terapéutico por sí mismos, pueden ser utilizados como plataforma para el diseño, desarrollo y optimización de nuevos agentes terapéuticos sintéticos.

PARTE III: Modulación alostérica por derivados de 1,2,3-triazol funcionalizados con grupos fosfonato

Antecedentes y objetivos específicos

Hasta el presente se han identificado numerosos compuestos que actúan como PAMs del receptor $\alpha 7$, siendo particularmente llamativa la gran diversidad estructural de los mismos, desde proteínas y péptidos hasta pequeñas moléculas (Introducción, págs. 32-33) (Faghih *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2011b). Se han descrito moduladores endógenos, como el péptido SLURP-1 y la proteína albúmina; y moduladores exógenos, que pueden ser de origen natural, como los flavonoides caracterizados en la parte II del presente capítulo de tesis, o de origen sintético, como la mayoría de los PAMs disponibles en la actualidad. A diferencia de los agonistas ortostéricos, cuyo farmacóforo y sitio de unión se encuentran extensamente documentados, la posible existencia de más de un sitio alostérico o de un sitio común que permita la unión de compuestos a distintos niveles complejiza notoriamente el hallazgo de nuevos PAMs. Del mismo modo, la enorme variedad estructural, incluyendo moléculas de distintos tamaños, anillos aromáticos, heterociclos con nitrógeno, oxígeno y/o azufre, donores y aceptores de puentes de hidrógeno, etc., constituye una desventaja al momento de identificar una estructura líder que guíe el desarrollo y optimización de potenciadores, aunque también brinda la posibilidad prácticamente ilimitada de explorar nuevos grupos funcionales para mejorar la potencia, eficacia y selectividad de los compuestos con potencial uso terapéutico.

Es posible distinguir dos generaciones en el desarrollo de moduladores alostéricos del receptor $\alpha 7$. Por un lado, los PAMs de primera generación incluyen compuestos endógenos y/o exógenos naturales no selectivos, con actividad $\alpha 7$ -PAM tipo I, eficacia moderada y baja potencia, como el 5-HI, la IVM y la galantamina (Faghih *et al.*, 2007, 2008; Williams *et al.*, 2011b). Por otro lado, los PAMs de segunda generación consisten en compuestos exógenos de origen sintético más selectivos, con actividad $\alpha 7$ -PAM tipo I o II, aunque muchos de ellos aún no han sido caracterizados de forma exhaustiva a nivel farmacológico ni biológico. Sus estructuras son muy diversas, incluyendo grupos urea o tioureas centrales disustituidas con anillos fenilo o heterociclos, ciclopentaquinolinas, diarilheterociclos, enamionas, tiazoles sustituidos con grupos fenilo o anilina, 1,2,4-triazoles trisustituidos, etc. (Faghih *et al.*, 2007, 2008; Chatzidaki *et al.*, 2015; Gill *et al.*, 2015).

Numerosos PAMs sintéticos de $\alpha 7$ presentan en su estructura **heterociclos nitrogenados** como piridinas, isoxazoles, tiazoles, pirazoles, indoles, etc. Sin embargo, los **triazoles** han sido poco explorados en el ámbito de los moduladores alostéricos de nAChRs, pese a que exhiben un amplio rango de actividades farmacológicas, incluyendo actividad antimicrobiana, analgésica, antiinflamatoria, anestésica, anticonvulsivante, antiproliferativa, antiparasitaria, antiviral, antifúngica y antihistamínica (Kharb *et al.*, 2011; Sahu *et al.*, 2013; Dheer *et al.*, 2017; Bozorov *et al.*, 2019). Los triazoles son

heterociclos orgánicos de cinco átomos, tres nitrógenos y dos carbonos, con dos insaturaciones en el anillo. Iniciando la numeración en los átomos de nitrógeno se pueden distinguir dos isómeros existentes: 1,2,3-triazoles y 1,2,4-triazoles. La funcionalidad de los **1,2,3-triazoles** no ha sido explorada hasta el momento en el diseño y desarrollo de $\alpha 7$ -PAMs, aun cuando han sido utilizados como plataforma o estructuras líder para la generación de numerosos fármacos en química medicinal, particularmente aquellos con sustituyentes en las posiciones 1 y 4 del anillo (Massarotti *et al.*, 2014; Dheer *et al.*, 2017). Por estas razones se decide sintetizar una serie de **1,2,3-triazoles 1,4-disustituídos** y evaluar su actividad sobre el receptor $\alpha 7$ en búsqueda de **nuevos PAMs de origen sintético** (Figura I.III.1). En la posición 1 se utilizaron como sustituyentes grupos arilo porque los anillos aromáticos son comunes en la mayoría de los PAMs actualmente reportados. En la posición 4 se eligió como sustituyente al **grupo fosfonato**, una función bioactiva novedosa que ha sido poco explotada y con un promisorio potencial para la terapéutica de diversos desórdenes de la salud humana (Metcalf y van der Donk, 2009; Yu *et al.*, 2013; Horsman y Zechel, 2017; Petkowski *et al.*, 2019).

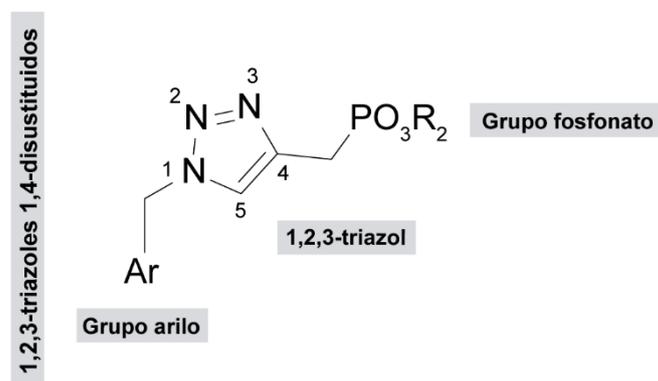


Figura I.III.1. Estructura básica de los 1,2,3-triazoles 1,4-disustituídos. Se muestra la estructura general de los derivados de 1,2,3-triazol sustituidos en la posición 1 con grupos arilo y en la posición 4 con grupos fosfonato.

El **ácido fosfónico** y sus ésteres **fosfonatos** presentan características estructurales y químicas únicas, dadas por el enlace fósforo-carbono (P-C) marcadamente más estable que los enlaces fósforo-oxígeno (P-O) de sus análogos ácido fosfórico y sus ésteres fosfatos, de fácil hidrólisis (Yu *et al.*, 2013; Horsman y Zechel, 2017; Petkowski *et al.*, 2019). Se han reportado fosfonatos con efectos como antibióticos, herbicidas, antivirales, antagonistas de receptores de Glu, fármacos anticancerosos, quelantes de metales, agentes antirreabsortivos óseos, inhibidores de enzimas como la AChE, etc. (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Metcalf y van der Donk, 2009; Martin *et al.*, 2015; Horsman y Zechel, 2017). Sin embargo, la actividad de este grupo funcional no ha sido explorada en los nAChRs, por lo cual se decidió utilizarlo como sustituyente en los derivados del triazol sintéticos.

Dado que la modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7$ constituye una estrategia terapéutica promisoriosa frente a desórdenes neurológicos y neurodegenerativos, el desarrollo y la caracterización de nuevos compuestos con actividad $\alpha 7$ -PAM resulta uno de los principales focos de

interés en química medicinal. Más allá de la existencia de PAMs endógenos y de origen natural, la síntesis química ofrece la ventaja de proveer compuestos líder o prototipo y realizar estudios de **relación-estructura actividad (SAR, Structure-Activity Relationship)** para mejorar la potencia, eficacia y selectividad. En la última parte del capítulo I se evalúan los mecanismos moleculares de acción de una novedosa serie de **1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos** funcionalizados con **grupos fosfonato** sobre el receptor $\alpha 7$ por técnicas electrofisiológicas a nivel macroscópico y microscópico, con la finalidad de contribuir a la búsqueda de nuevos **PAMs de origen sintético**, estableciendo esta estructura base como un potencial farmacóforo para el diseño y optimización de agentes terapéuticos. Por lo tanto, se plantean los siguientes **objetivos específicos de la parte III**:

- Sintetizar una serie de compuestos derivados de 1,2,3-triazol, disustituidos con grupos aromáticos en la posición 1 y con grupos fosfonato en la posición 4.
- Caracterizar los efectos de los derivados de 1,2,3-triazol sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias, identificando aquellos con actividad $\alpha 7$ -PAM.
- Describir los efectos de los derivados de 1,2,3-triazol con actividad $\alpha 7$ -PAM a nivel de corrientes unitarias y de corrientes macroscópicas.
- Evaluar los determinantes estructurales de la actividad $\alpha 7$ -PAM de los derivados de 1,2,3-triazol, utilizando los receptores quiméricos $\alpha 7$ -5HT₃A HC y quintuple mutante $\alpha 7$ TSLMF.
- Realizar estudios de relación estructura-actividad sobre los compuestos de mayor eficacia, incluyendo reacciones de homologación, inversión de la geometría del triazol y modificación del grupo arilo.

Resultados

1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN INICIAL DE 1,2,3-TRIAZOLES 1,4-DISUSTITUIDOS FUNCIONALIZADOS CON GRUPOS FOSFONATO

1.1. Síntesis

Inicialmente una primera serie de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos, incluyendo los derivados funcionalizados con grupos fosfonato y ácido fosfónico, fueron sintetizados en el Laboratorio de Catálisis y Síntesis de Compuestos Bioactivos del INQUISUR (Figura I.III.2, Tabla I.III.1). La reacción principal en este proceso de síntesis fue la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos terminales catalizada por cobre, denominada “cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen”. En particular, se utilizaron como catalizadores nanopartículas de cobre soportadas sobre carbón activado (CuNPs/C, *Copper Nanoparticles/activated Carbon*) (Alonso *et al.*, 2015).

El derivado **1** de triazol que presenta un grupo **hidroxilo** se formó a partir de 1-clorometilnaftaleno y alcohol propargílico en presencia de NaN_3 para preformar la azida orgánica y CuNPs/C como catalizador de la reacción de cicloadición. Luego el compuesto **1** fue transformado en su correspondiente **bromuro 2**, el cual fue sometido a la reacción de Michaelis-Becker con distintos dialquilfosfitos para obtener los **fosfonatos 3a-b**. Finalmente se obtuvo el **ácido fosfónico 4** por reacción de **3a** con bromotrimetilsilano (TMSBr) (Figura I.III.2).

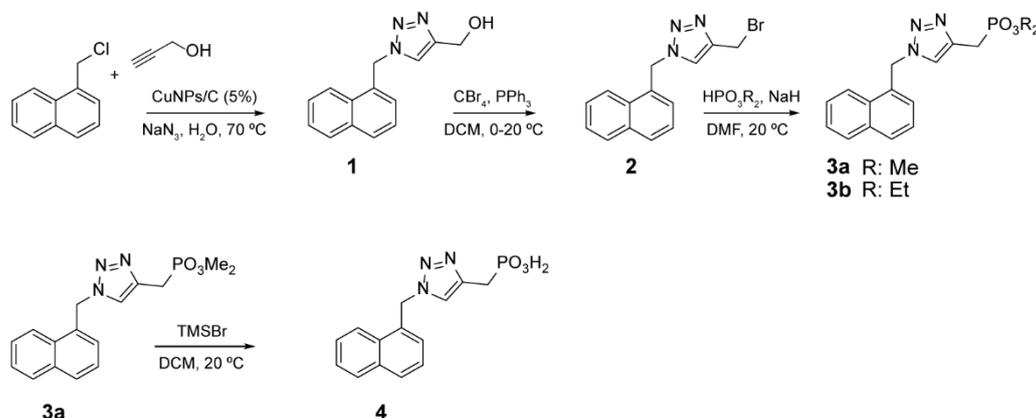


Figura I.III.2. Esquema de la síntesis de la serie I de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos. DCM: diclorometano, DMF: dimetilformamida, TMSBr: bromotrimetilsilano.

1.2. Evaluación de la actividad biológica sobre el receptor $\alpha 7$ homomérico

La actividad biológica de los compuestos de la serie I sobre $\alpha 7$ fue evaluada a través de registros de corrientes unitarias en células BOSC23 por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached*, a un potencial de membrana de -70 mV. En el cribado o *screening* inicial de actividad se utilizaron concentraciones de 20-50-100 μM , basándose en las concentraciones funcionales de PAMs previamente reportados y considerando que el rango micromolar es el más promisorio a nivel

terapéutico. Tras descartar la actividad agonista de los compuestos, ya que por sí mismos no activaron al receptor $\alpha 7$, se evaluó su actividad $\alpha 7$ -PAM al coaplicarlos con ACh 100 μ M (CE_{50}). Se seleccionó una concentración intermedia (50 μ M) para efectuar las comparaciones entre todos los compuestos (Figura I.III.3, Tabla I.III.2).

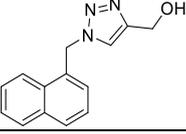
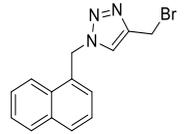
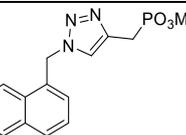
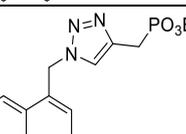
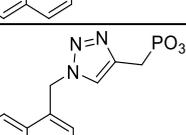
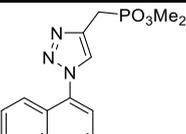
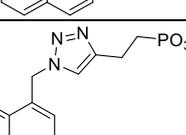
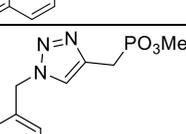
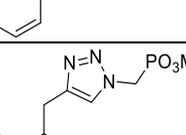
Nº	Estructura	Nombre IUPAC
Serie I		
1		{1-[(naftalen-1-il) metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il} metanol.
2		4-(bromometil)-1-[(naftalen-1-il)metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol.
3a		dimetil ({1-[(naftalen-1-il) metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il} metil) fosfonato.
3b		dietil ({1-[(naftalen-1-il) metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il} metil) fosfonato.
4		Ácido ({1-[(naftalen-1-il) metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il} metil) fosfónico.
Serie II		
5		dimetil {[1-(naftalen-1-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il} metil} fosfonato.
6		dimetil (2-{1-[(naftalen-1-il) metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il} etil) fosfonato.
7		dimetil [(1-bencil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil] fosfonato.
8		dimetil ({4-[(naftalen-1-il) metil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il} metil) fosfonato.

Tabla I.III.1. Estructura y nomenclatura de los derivados de 1,2,3-triazol 1,4-disustituídos series I y II. Se muestran la numeración empleada en el presente capítulo de tesis, la estructura química y la nomenclatura IUPAC para cada compuesto evaluado.

Si bien el primer intermediario de la síntesis, el compuesto **1**, no modificó el tiempo de estado abierto, indujo una leve prolongación de la duración de los episodios de activación en *bursts* (~1,2 veces, Figura I.III.3, Tabla I.III.2). Los histogramas de duración de aperturas y de *bursts* se ajustaron con dos componentes exponenciales al igual que para el receptor $\alpha 7$ activado por la ACh, sin observarse cambios en el $\tau_{\text{crítico}}$ definido entre el primer y el segundo componentes del histograma de estado cerrado (Figura I.III.3). Por el contrario, el segundo intermediario de la síntesis, el compuesto **2**, no ejerció ningún efecto sobre las corrientes unitarias de $\alpha 7$ activado por la ACh (Figura I.III.3, Tabla I.III.2). Este hallazgo sugirió que la diferencia de polaridad en el grupo sustituyente del metilo de la posición 4 del triazol podría estar involucrada en el efecto diferencial observado, ya que el compuesto **1** posee un **hidroxilo**, más polar, mientras que el compuesto **2**, presenta un **bromuro**, más apolar. El hecho de que el intermediario más polar haya exhibido cierto efecto modulador, sustentó el interés de evaluar los derivados de 1,2,3-triazol funcionalizados con grupos fosfonato, ya que los mismos permitirían un incremento más sustancial de la polaridad en esa posición de la molécula.

De los derivados funcionalizados con grupos fosfonato, el compuesto **3a**, que presenta el **fosfonato de metilo**, exhibió una notoria actividad $\alpha 7$ -PAM, prolongando significativamente la duración de las aperturas en ~4 veces y de los episodios de activación o *bursts* en ~7 veces (Figura I.III.3, Tabla I.III.2). El compuesto **3b**, que posee el **fosfonato de etilo**, también ejerció un efecto modulador positivo sobre la actividad de $\alpha 7$, potenciando el tiempo de estado abierto en ~2,5 veces y los *bursts* en ~4,5 veces (Figura I.III.3, Tabla I.III.2). Para ambos compuestos, los histogramas de duración de aperturas y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales (Figura I.III.3). Para el compuesto **3a**, el $\tau_{\text{crítico}}$ fue de ~1-3 ms, definido en la intersección entre el segundo y el tercer componentes del histograma de estado cerrado; mientras que para el compuesto **3b**, el $\tau_{\text{crítico}}$ fue de ~0,1-0,5 ms, definido en la intersección entre el primer y el segundo componentes del histograma de estado cerrado. Por su parte, el compuesto **4**, que contiene el grupo **ácido fosfónico**, no ejerció efecto potenciador a 50 μM , por lo cual no se observaron diferencias significativas con respecto a los parámetros obtenidos para el receptor $\alpha 7$ activado únicamente por la ACh (Figura I.III.3).

Receptor	Agonista	Compuestos serie I	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)	n	N
$\alpha 7$	ACh 100 μM	-	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$	7	6
		1	$0,30 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,05^{**}$	7	3
		2	$0,29 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,07$	4	3
		3a	$1,06 \pm 0,04^{***}$	$2,26 \pm 0,34^{***}$	4	3
		3b	$0,68 \pm 0,12^{***}$	$1,46 \pm 0,67^{***}$	7	5
		4	$0,25 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,07$	4	3

Tabla I.III.2. Efecto de la serie I de derivados de 1,2,3-triazol 1,4-disustituidos sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts* en presencia de ACh y los distintos compuestos. Los datos se presentan como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en presencia únicamente de ACh.

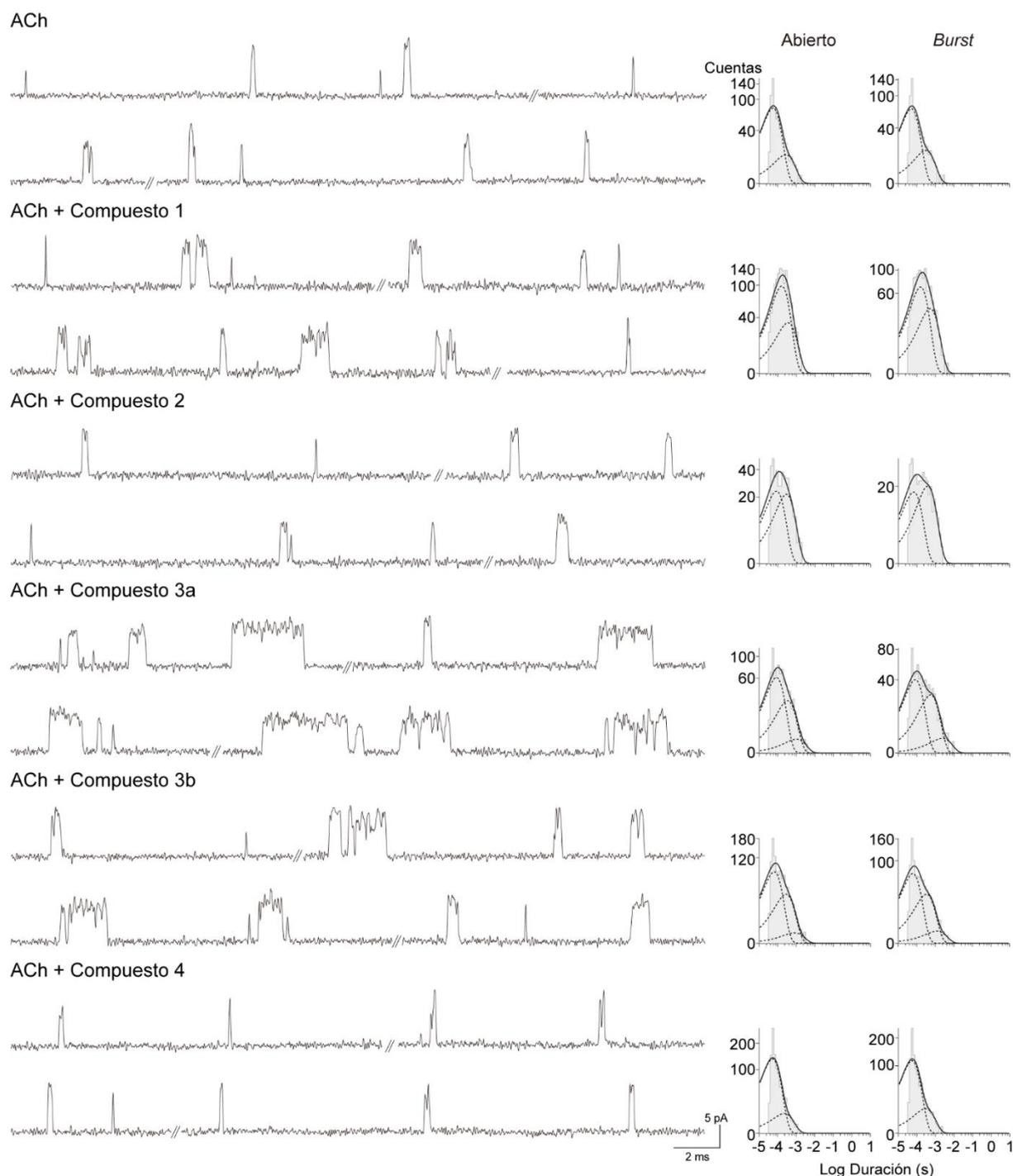


Figura I.III.3. Efecto de los derivados de 1,2,3-triazol 1,4-disustituidos de la serie I sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia y en presencia de los distintos compuestos a 50 μM . Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición.

Al analizar el efecto de los 1,2,3-triazoles funcionalizados con grupos fosfonato y ácido fosfónico en un rango de concentraciones más extenso de 5-150 μM (Tabla I.III.3), se observó que el compuesto **3a** fue el más potente y eficaz, ejerciendo efecto a partir de 10 μM . Por su parte, los compuestos **3b** y **4** ejercieron potenciación significativa sólo a una de las concentraciones evaluadas, 50 μM y 10 μM respectivamente, e incluso el primero inhibió al receptor a concentraciones muy elevadas. El

compuesto **3b** potenció las aperturas en menor medida que el compuesto **3a** ($p < 0,001$), mientras que los *bursts* no exhibieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos fosfonatos a la concentración de máximo efecto (50 μM). A diferencia de los ésteres, el compuesto **4** prolongó únicamente los *bursts*, en menor medida que el compuesto **3a** ($p < 0,01$) y sin diferencias con respecto al compuesto **3b** ($p > 0,05$). En base a la duración del *burst* se definió entonces el siguiente orden de eficacia: **3a** \geq **3b** \geq **4**. En consecuencia, se decidió continuar con la caracterización detallada del compuesto **3a**, por ser el derivado de 1,2,3-triazol sintetizado con mayor actividad $\alpha 7$ -PAM, y se procedió posteriormente a la realización de estudios SAR sobre dicha estructura.

Receptor	Agonista	Compuesto (μM)	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)	n	N	
$\alpha 7$	ACh 100 μM	-	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$	7	6	
		3a	5	$0,22 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,09$	6	4
			10	$1,05 \pm 0,02^{***}$	$2,08 \pm 0,13^{***}$	6	4
			50	$1,06 \pm 0,04^{***}$	$2,26 \pm 0,34^{***}$	4	3
			100	$0,52 \pm 0,01^{***}$	$0,96 \pm 0,04^{***}$	4	3
			150	$0,13 \pm 0,02^{***}$	$0,25 \pm 0,05$	4	3
		3b	5	$0,42 \pm 0,27$	$0,48 \pm 0,27$	4	3
			10	$0,35 \pm 0,13$	$0,40 \pm 0,14$	5	3
			50	$0,68 \pm 0,12^{***}$	$1,46 \pm 0,67^{***}$	7	5
			100	$0,20 \pm 0,03^{**}$	$0,23 \pm 0,06^*$	4	3
			150	$0,14 \pm 0,04^{***}$	$0,24 \pm 0,09$	4	3
		4	5	$0,23 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,14$	4	3
			10	$0,26 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,43^{***}$	8	3
			50	$0,25 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,07$	4	3
			100	$0,26 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,06$	4	3
			150	$0,22 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,09$	4	3

Tabla I.III.3. Efecto de los derivados de 1,2,3-triazol funcionalizados con grupo fosfonato y ácido fosfónico sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts* en presencia de ACh y los distintos compuestos en un rango de concentraciones de 5-150 μM . Los datos se presentan como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control únicamente en presencia de ACh.

2. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL 1,2,3-TRIAZOL FUNCIONALIZADO CON EL GRUPO FOSFONATO DE METILO (3a) SOBRE EL RECEPTOR $\alpha 7$ HOMOMÉRICO

2.1. Modulación alostérica positiva

Dado que el compuesto **3a** con la función fosfonato de metilo resultó ser el PAM más eficaz entre los derivados de 1,2,3-triazol evaluados, se procedió a caracterizar en profundidad su accionar a nivel macroscópico y microscópico. Las **corrientes macroscópicas** fueron obtenidas por la técnica de *patch-clamp* sobre células BOSC23 en configuración *whole-cell* a un potencial de membrana de -50 mV. El compuesto **3a** potenció la corriente evocada por la ACh incrementando significativamente el pico de corriente en $1,51 \pm 0,26$ veces ($p < 0,001$, $n = 7$, $N = 3$, Figura I.III.4C). La velocidad de decaimiento se ajustó con dos componentes, $\tau_{\text{rápido}}$ de 29 ± 14 ms y τ_{lento} de 901 ± 649 ms, sin observarse una

disminución con respecto a los componentes de la corriente de control ($\tau_{\text{rápido}} = 37 \pm 7$ ms y $\tau_{\text{lento}} = 1294 \pm 1334$ ms). De hecho, en presencia del compuesto **3a**, la velocidad del componente rápido fue ligeramente mayor ($p=0,03 < 0,05$). La carga neta prácticamente no se modificó ($1,02 \pm 0,22$, $p > 0,05$) y la relación carga neta/pico fue cercana a uno, con un valor de $0,68 \pm 0,15$.

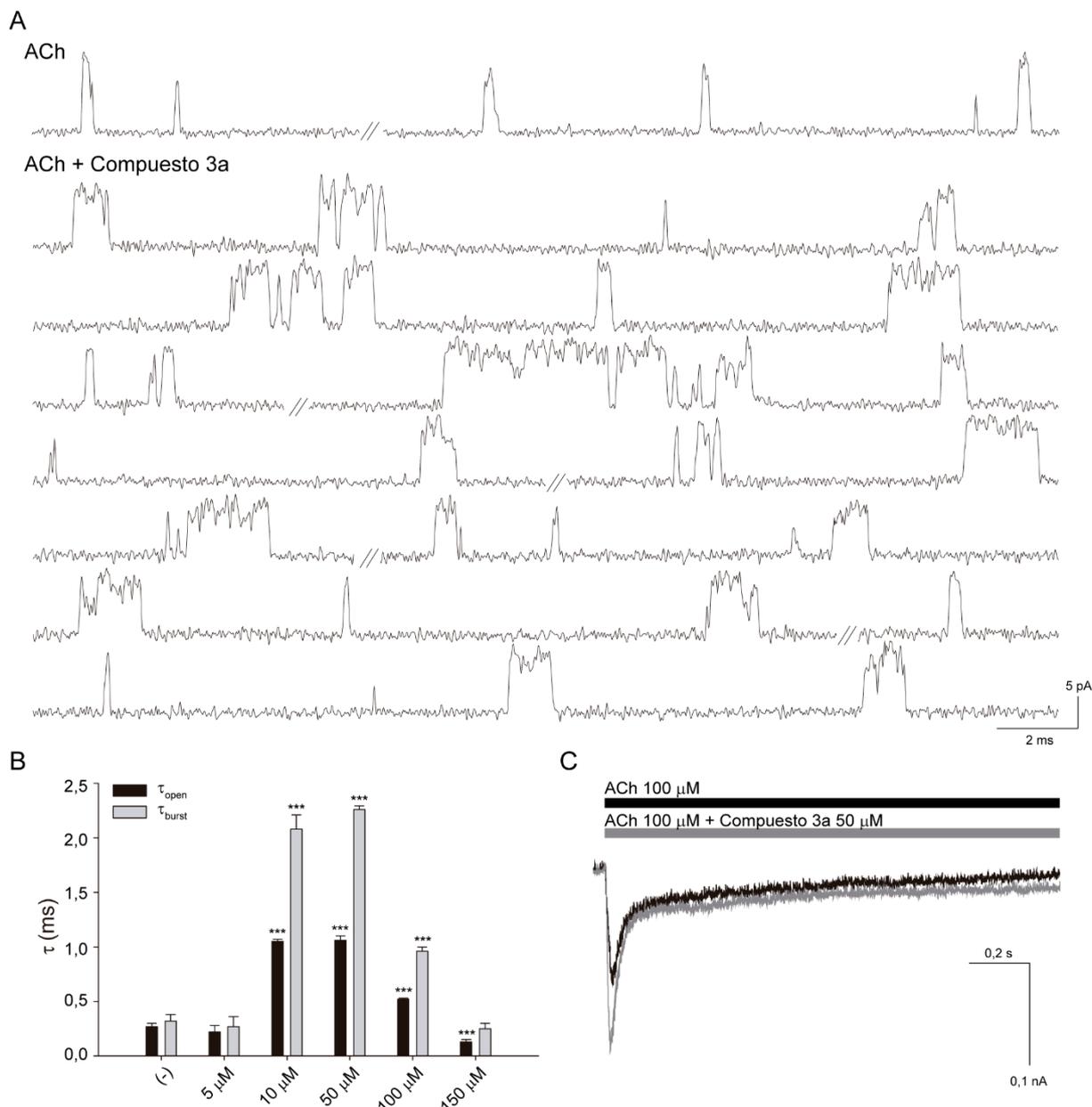


Figura I.III.4. Efecto del derivado de 1,2,3-triazol 1,4-disustituido funcionalizado con el grupo fosfonato de metilo (compuesto 3a) sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias y macroscópicas. A- Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia y en presencia del compuesto 3a 50 μM . Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. **B-** Gráfico de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (negro) y de *burst* (gris). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en ausencia de compuesto. **C-** Corriente macroscópica representativa del receptor $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia (trazo negro) y en presencia del compuesto 3a (trazo gris). Las barras horizontales en negro y en gris indican los períodos de aplicación del agonista solo y junto con el compuesto respectivamente. Potencial de membrana: -50 mV.

Respecto de las **corrientes unitarias** de $\alpha 7$ activadas por la ACh y moduladas por el compuesto **3a** en un rango de concentraciones de 5-150 μM (Tabla I.III.3, Figura I.III.4B), la potenciación fue evidente a partir de 10 μM y permaneció en su máximo nivel hasta 50 μM , prolongándose las aperturas y los episodios de activación en *bursts* a ~ 1 ms y ~ 2 ms respectivamente (Figura I.III.4A-B). A 100 μM , el efecto potenciador se mantuvo, pero disminuyó levemente con respecto a la máxima potenciación ($p < 0,001$ para ambos parámetros cinéticos, Figura I.III.4B). A 150 μM ya no se detectó potenciación, observándose incluso inhibición en el tiempo de estado abierto, probablemente por bloqueo a altas concentraciones del compuesto, lo cual también podría explicar la disminución del efecto observada a 100 μM (Tabla I.III.3, Figura I.III.4B). La amplitud máxima de las corrientes unitarias no se modificó en presencia del compuesto **3a**, que incluso favoreció su completa resolución al prolongar las duraciones de los eventos, dando un valor medio de $9,76 \pm 0,37$ pA, sin diferencias significativas con respecto a la amplitud del canal activado únicamente por la ACh que fue de $9,99 \pm 0,41$ pA ($p > 0,05$, $n = 4$, $N = 4$ en cada caso, Figura I.III.4A).

En resumen, el compuesto **3a** incrementó el pico de la corriente macroscópica de $\alpha 7$ inducida por la ACh sin modificar significativamente la velocidad de desensibilización, no afectó la conductancia unitaria de los canales, prolongó la duración de las aperturas e indujo la activación en episodios de activación sostenidos en *bursts*, modificando la cinética de una forma perceptible únicamente a nivel de canal único. Todas estas características permitieron clasificar al compuesto **3a** como el **primer derivado sintético de 1,2,3-triazol funcionalizado con grupos fosfonato** con actividad **$\alpha 7$ -PAM**, específicamente de **tipo I**.

2.2. Determinantes estructurales de la potenciación

Con el objetivo de identificar los principales dominios del receptor $\alpha 7$ involucrados en la potenciación ejercida por el compuesto **3a**, inicialmente se exploró su efecto sobre el **receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A HC** (Bouzat *et al.*, 2004; Rayes *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 2016). Se realizaron registros de las corrientes unitarias del receptor quimérico por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 a un potencial de membrana de -70 mV. Las concentraciones utilizadas fueron 500 μM para ACh y 50 μM para el derivado del triazol (máximo efecto en receptor $\alpha 7$) (Figura I.III.5). El compuesto **3a** no ejerció potenciación sobre la quimera, siendo la duración de las aperturas de $5,01 \pm 0,56$ ms y la duración de los *bursts* de $10,89 \pm 3,06$ ms ($n = 4$, $N = 3$), sin diferencias significativas con respecto a los parámetros del receptor activado únicamente por la ACh ($\tau_{\text{open}} = 5,26 \pm 0,30$ ms y $\tau_{\text{burst}} = 12,35 \pm 3,00$ ms, $n = 5$, $N = 4$, $p > 0,05$ en cada caso). En ambas condiciones los histogramas de estado abierto y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales cada uno, y no se observaron cambios en el $\tau_{\text{crítico}}$, el cual fue definido entre los componentes segundo y tercero del histograma de estado cerrado (~ 2 -5 ms) (Figura I.III.5). Por lo

tanto, el compuesto **3a** no actuó como PAM del receptor quimérico, sugiriendo un rol preponderante del TMD o de la interfaz ECD-TMD de $\alpha 7$ en su efecto potenciador.

Para profundizar en los determinantes estructurales de potenciación del derivado de triazol se utilizó el **receptor quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF** (Young *et al.*, 2008; DaCosta *et al.*, 2011). Las corrientes unitarias fueron registradas por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 a un potencial de membrana de -70 mV. Se utilizaron concentraciones de 100 μ M para ACh y 50 μ M para el compuesto **3a** (máximo efecto en receptor $\alpha 7$) (Figura I.III.5). En presencia del compuesto las aperturas fueron de $1,04 \pm 0,20$ ms y los *bursts* de $1,76 \pm 0,05$ ms ($n = 4$, $N = 3$), sin diferencias significativas con los parámetros cinéticos del receptor quíntuple mutante activado únicamente por la ACh ($\tau_{open} = 1,26 \pm 0,43$ ms y $\tau_{burst} = 1,98 \pm 0,74$ ms, $n = 5$, $N = 4$, $p > 0,05$ en cada caso). Los histogramas de estado abierto y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales en ambos casos, y el $\tau_{crítico}$ quedó definido por la intersección entre el segundo y el tercer componentes del histograma de estado cerrado ($\sim 1-4$ ms). Por lo tanto, los cinco residuos de la cavidad transmembrana, o al menos algunos de ellos, resultaron esenciales para la potenciación mediada por este derivado del 1,2,3-triazol funcionalizado con el grupo fosfonato.

Estos resultados revelaron que, pese a que el compuesto **3a** se comportó como PAM tipo I, comparte **determinantes estructurales de potenciación transmembrana** con el prototipo de PAM tipo II PNU-120596, semejando el comportamiento del PAM tipo I NS-1738 y de los flavonoides, descritos previamente en el presente capítulo de tesis.

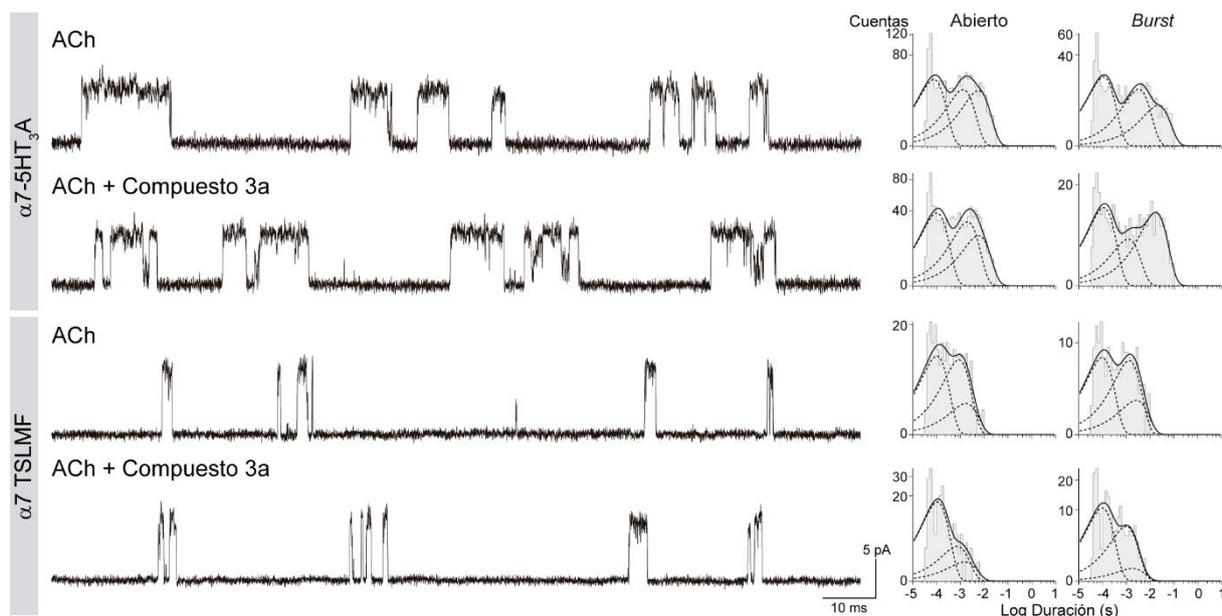


Figura I.III.5. Determinantes estructurales de la potenciación por el derivado de 1,2,3-triazol 1,4-disustituido funcionalizado con el grupo fosfonato de metilo (compuesto 3a). Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ -5HT₃A HC activado por ACh 500 μ M (porción superior) y de $\alpha 7$ TSLMF activado por ACh 100 μ M (porción inferior) en ausencia y en presencia del compuesto **3a** 50 μ M. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición.

2.3. Estudios de relación estructura-actividad

Teniendo en cuenta que el compuesto **3a** funcionalizado con el grupo fosfonato de metilo resultó ser el compuesto más eficaz de la serie I, se realizaron estudios **SAR** sobre el mismo. Estos se basan en establecer una relación cualitativa entre una estructura y/o alguno de los grupos funcionales que contiene, con la presencia o ausencia de una propiedad o actividad de interés. En este caso, la actividad de interés es biológica, particularmente la capacidad de ejercer modulación alostérica positiva sobre el receptor $\alpha 7$. Es así que se sintetizó la **serie II** de derivados de 1,2,3-triazol (Tabla I.III.1) en el Laboratorio de Catálisis y Síntesis de Compuestos Bioactivos del INQUISUR, realizando las siguientes modificaciones sobre la estructura del compuesto **3a**: variación de la distancia entre los grupos triazol y arilo, variación de la distancia entre los grupos triazol y fosfonato, variación del núcleo aromático o grupo arilo, e inversión de la geometría del triazol (Figura I.III.6). La actividad biológica de los distintos compuestos derivados del fosfonato de metilo fue evaluada a través de registros de corrientes unitarias en células BOSC23 por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached*, a un potencial de membrana de -70 mV. Se utilizó ACh $100 \mu\text{M}$ para activar al receptor $\alpha 7$, y una concentración de $50 \mu\text{M}$ de los compuestos derivados, considerando que a dicha concentración el compuesto **3a** ejerció la máxima potenciación.

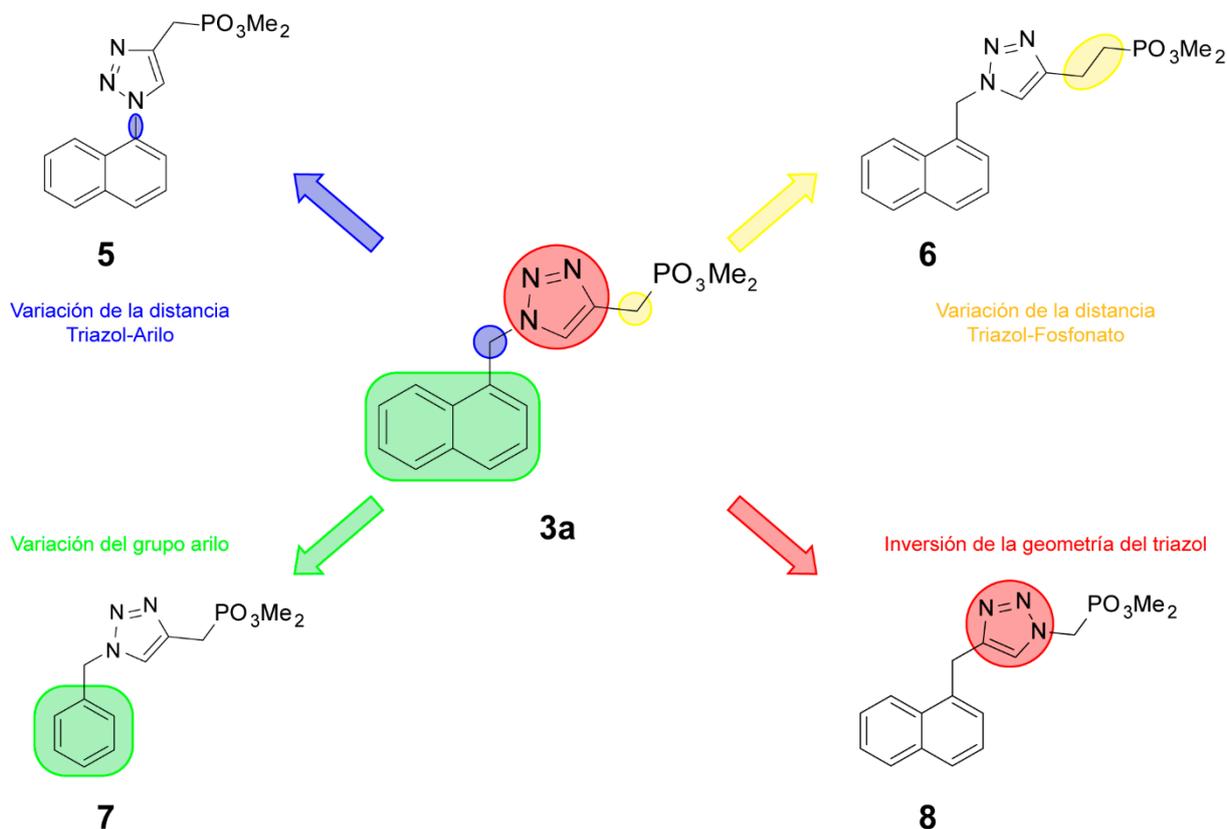


Figura I.III.6. Estudios SAR realizados sobre la estructura del compuesto **3a**. Se muestran las estructuras de los compuestos obtenidos por las distintas estrategias, resaltando las modificaciones efectuadas.

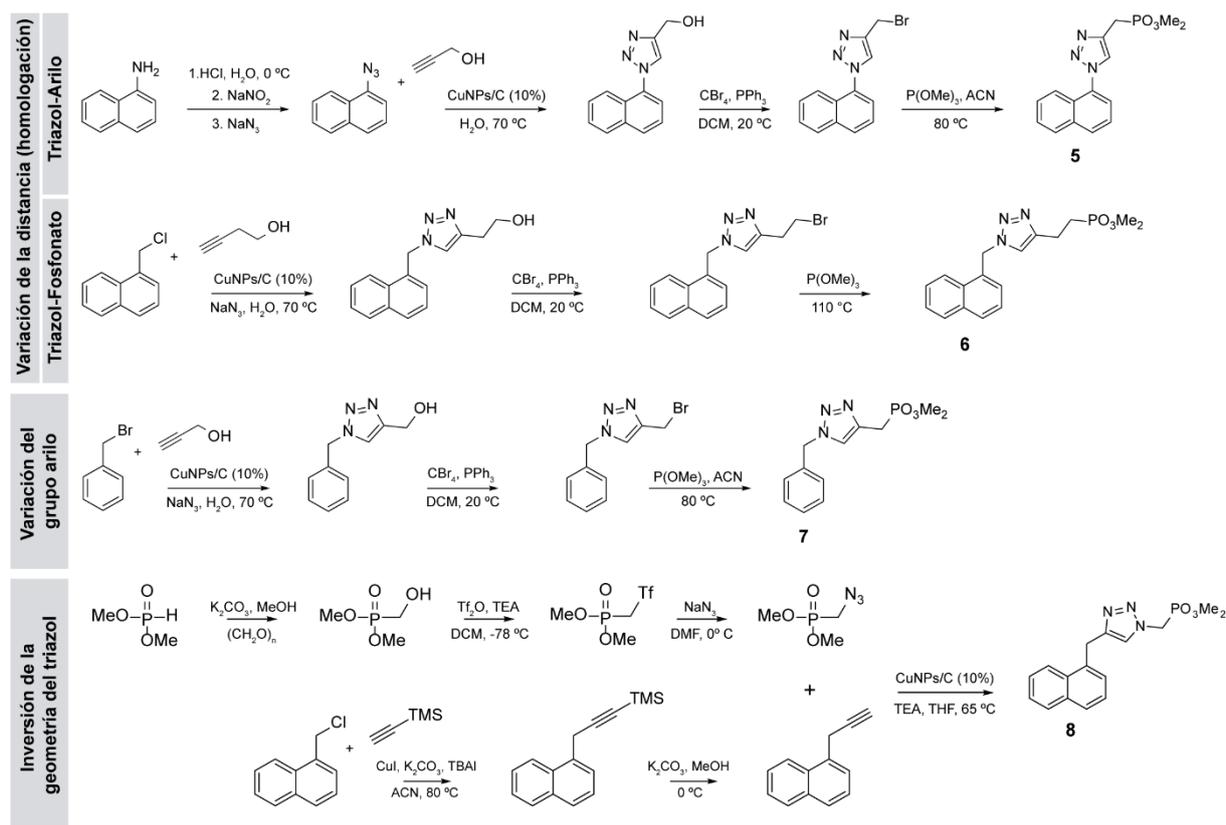


Figura I.III.7. Esquema de la síntesis de la serie II de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos. DCM: diclorometano, ACN: acetonitrilo, TEA: trietilamina, DMF: dimetilformamida, THF: tetrahydrofolato.

2.3.1. Variación de la distancia triazol-grupo arilo

El compuesto **3a** presenta un átomo de carbono en la conexión entre el anillo de triazol y el grupo arilo, en este caso un grupo naftilo. Para determinar la distancia óptima entre esos dos grupos se sintetizó el **compuesto 5**, un homólogo del compuesto **3a**, donde el grupo naftilo se encuentra directamente unido al triazol, extendiendo la conjugación entre ambos anillos aromáticos (Figura I.III.6). Para la síntesis se obtuvo el precursor 1-azidonaftaleno vía sal de diazonio, se procedió a la reacción de cicloadición utilizando CuNPs/C como catalizador y finalmente se formó el fosfonato a través de la reacción de Arbuzov con trimetil fosfito (Figura I.III.7).

Respecto de la actividad biológica, de un total de diez registros sólo uno exhibió potenciación a nivel de las aperturas (~1 ms), y únicamente tres registros evidenciaron potenciación a nivel de los *bursts* ($1,28 \pm 0,27$ ms), la cual fue significativa con respecto al control en ausencia de moduladores ($p < 0,05$), pero inferior a la ejercida por el compuesto **3a** ($p < 0,05$). Sin embargo, la mayoría de los registros no exhibieron diferencias significativas en los parámetros cinéticos de duración de aperturas y de episodios de activación con respecto al control ($p > 0,05$ en cada caso, Tabla I.III.4, Figura I.III.8), siendo significativamente inferiores a los valores obtenidos en presencia del compuesto **3a** (Tabla I.III.4). Los histogramas de aperturas y *bursts* se ajustaron con dos componentes exponenciales al igual

que para el receptor $\alpha 7$ activado por la ACh, sin observarse cambios en el $\tau_{\text{crítico}}$ definido entre el primer y el segundo componentes del histograma de estado cerrado (Figura I.III.8A). Se concluyó entonces que el acortamiento de la distancia triazol-grupo arilo en el compuesto **5** perjudicó la actividad $\alpha 7$ -PAM del derivado de triazol.

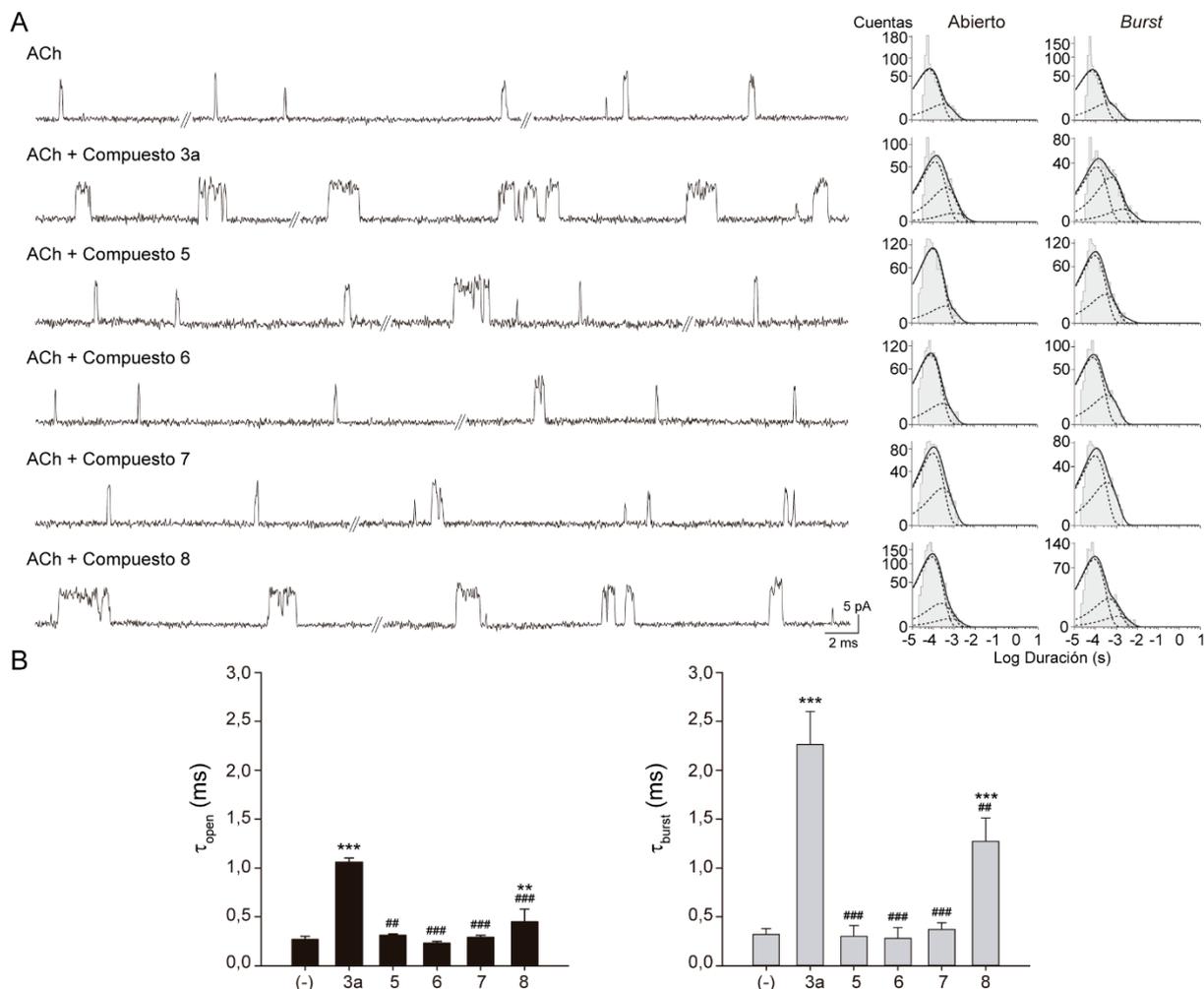


Figura I.III.8. Efecto de los derivados de 1,2,3-triazol 1,4-disustituidos de la serie II sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. A- Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia y en presencia de los distintos compuestos a 50 μM . Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. **B-** Gráficos de barras de las constantes de tiempo de estado abierto (negro) y de *burst* (gris). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en ausencia de compuesto (*) y contra la condición experimental con compuesto 3a (#).

2.3.2. Variación de la distancia triazol-grupo fosfonato

El compuesto **3a** presenta un átomo de carbono en la conexión entre el anillo de triazol y el grupo fosfonato. Para determinar la distancia óptima entre esos dos grupos se sintetizó el **compuesto 6**, un homólogo del compuesto **3a**, donde se alargó la cadena alifática entre el grupo fosfonato y el triazol con un carbono adicional (Figura I.III.6). Para la síntesis, inicialmente se procedió de igual

manera que para el compuesto **3a**, pero utilizando al 3-butin-1-ol en lugar de alcohol propargílico. Luego se efectuó la reacción de cicloadición utilizando CuNPs/C como catalizador y se formó el fosfonato a través de la reacción de Arbuzov con trimetil fosfito (Figura I.III.7).

Respecto de la actividad biológica, el compuesto **6** no potenció al receptor $\alpha 7$, ya que no hubo diferencias significativas en las duraciones de las aperturas y de los *bursts* con respecto la condición control ($p > 0,05$) (Tabla I.III.4, Figura I.III.8). Los histogramas de aperturas y de *bursts* se ajustaron con dos componentes exponenciales al igual que para el receptor $\alpha 7$ activado por la ACh, sin observarse cambios en el $\tau_{\text{crítico}}$ determinado en la intersección entre el primer y el segundo componentes del histograma de estado cerrado (Figura I.III.8A). Las constantes de tiempo, a su vez, fueron significativamente menores a las obtenidas en presencia del compuesto **3a** (Tabla I.III.4, Figura I.III.8). Por lo tanto, se concluyó que el alargamiento de la cadena carbonada entre el anillo de triazol y el grupo fosfonato anuló la actividad $\alpha 7$ -PAM.

Receptor	Agonista	Compuesto	τ_{open} (ms)	τ_{burst} (ms)	n	N
$\alpha 7$	ACh 100 μM	-	$0,27 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,06$	7	6
		3a	$1,06 \pm 0,04$	$2,26 \pm 0,34$	4	3
		5	$0,31 \pm 0,16^{\#\#}$	$0,30 \pm 0,11^{\#\#\#}$	10	5
		6	$0,23 \pm 0,08^{\#\#\#}$	$0,28 \pm 0,11^{\#\#\#}$	7	4
		7	$0,29 \pm 0,02^{\#\#\#}$	$0,37 \pm 0,07^{\#\#\#}$	5	3
		8	$0,45 \pm 0,13^{** \#\#\#}$	$1,27 \pm 0,24^{*** \#\#}$	4	3

Tabla I.III.4. Efecto de la serie II de derivados de 1,2,3-triazol 1,4-disustituídos sobre $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts* en presencia de ACh y los distintos compuestos. Los datos se presentan como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra las condiciones control con ACh sola (*) o junto con el compuesto **3a** (#).

2.3.3. Variación del grupo arilo

El compuesto **3a** presenta como grupo arilo un naftaleno, conformado por dos anillos de benceno fusionados. Para determinar la influencia del grupo arilo sobre el efecto potenciador se sintetizó el **compuesto 7**, un análogo del compuesto **3a** con un anillo individual de benceno en lugar del grupo naftilo (Figura I.III.6). En la síntesis se empleó bromuro de bencilo para realizar la reacción de sustitución con NaN_3 y cicloadición con alcohol propargílico, y luego se continuó con la secuencia habitual de reacciones para obtener el fosfonato (Figura I.III.7).

Respecto de la actividad biológica, el compuesto **7** no ejerció ningún efecto significativo sobre el receptor $\alpha 7$, ya que las duraciones de las aperturas y de los *bursts* fueron similares en presencia y en ausencia de compuesto ($p > 0,05$) (Tabla I.III.4, Figura I.III.8). Los histogramas de aperturas y de *bursts* se ajustaron con dos componentes exponenciales al igual que para el receptor $\alpha 7$ activado por la ACh, sin observarse cambios en el $\tau_{\text{crítico}}$ definido entre el primer y el segundo componentes del histograma de estado cerrado (Figura I.III.8A). Las constantes de tiempo disminuyeron significativamente con

respecto a las obtenidas en presencia del compuesto **3a** (Tabla I.III.4, Figura I.III.8). Por lo tanto, se concluyó que la variación del grupo arilo de un naftaleno a un benceno anuló la actividad $\alpha 7$ -PAM.

2.3.4. Inversión de la geometría del triazol

El compuesto **3a** presenta el anillo de triazol 1,4-disustituido con átomos de carbono que median la conexión al grupo arilo en la posición 1 y al grupo fosfonato en la posición 4. Para determinar la influencia de la posición de dichos grupos se sintetizó un análogo del compuesto **3a** en el cual se invirtieron los sustituyentes sobre el anillo de triazol, denominado **compuesto 8** (Figura I.III.6). Para la síntesis, por un lado y dada la inversión del triazol, fue preciso disponer de una azida orgánica que contenga el grupo fosfonato. La misma se obtuvo por reacción del dimetil fosfito con paraformaldehído en presencia de carbonato de potasio como base, generándose hidroximetilfosfonato de dimetilo (Figura I.III.7) (Jeanmaire *et al.*, 2002). Luego se formó el triflato de dicho compuesto y se sustituyó con NaN_3 para obtener la azida deseada. Por otro lado, el alquino precursor se obtuvo tras desproteger el producto de la reacción de acoplamiento entre 1-clorometil naftaleno y trimetilsililacetileno, empleando CuI como catalizador (Figura I.III.7) (Davies *et al.*, 2009). Una vez obtenidos ambos precursores, nuevamente se llevó a cabo la reacción de cicloadición catalizada por CuNPs/C para sintetizar el compuesto **8** (Figura I.III.7).

Respecto de la actividad biológica, el compuesto **8** también ejerció un efecto potenciador sobre el receptor $\alpha 7$, ya que prolongó significativamente las duraciones de las aperturas y de los episodios de activación en *bursts* (Tabla I.III.4, Figura I.III.8). Los histogramas de aperturas y *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales, y el $\tau_{\text{crítico}}$ fue definido en la intersección entre el segundo y el tercer componentes del histograma de estado cerrado (~ 1 -3 ms) (Figura I.III.8). Pese a que la potenciación fue notable, las constantes de tiempo disminuyeron con respecto a las obtenidas en presencia del compuesto **3a** (Tabla I.III.8). Por lo tanto, se concluyó que la inversión de los sustituyentes del anillo de triazol en el compuesto **8** le permitió retener la actividad $\alpha 7$ -PAM, aunque la misma se redujo levemente.

Discusión

La potenciación o modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7$ homomérico constituye una de las estrategias terapéuticas más prometedoras para el tratamiento de diversos trastornos neurológicos, psiquiátricos, inflamatorios y/o neurodegenerativos que se presentan con una deficiente señalización colinérgica (Thomsen *et al.*, 2010; Dineley *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Bouzat *et al.*, 2018). Los PAMs ofrecen numerosas ventajas en comparación a los ligandos ortostéricos, incluyendo mayor selectividad, menor proporción de efectos adversos, menor tolerancia y/o dependencia, y mantenimiento del patrón temporal y espacial de secreción del agonista endógeno (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Williams *et al.*, 2011b; Chatzidaki y Millar, 2015; Corradi y Bouzat, 2016; Bouzat *et al.*, 2018). El desarrollo de **PAMs exógenos de origen sintético** no sólo ofrece la posibilidad de proveer compuestos prototipo, sino también de realizar diversas modificaciones estructurales que mejoren propiedades farmacológicas como la eficacia, potencia y selectividad, reduciendo así los efectos adversos. En la tercera parte del capítulo I de la presente tesis se sintetizó una novedosa **serie de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituídos con grupos arilo y fosfonato** cuya actividad biológica sobre el receptor $\alpha 7$ fue evaluada por técnicas electrofisiológicas, con el objetivo de dilucidar su mecanismo de acción a nivel molecular y proporcionar una estructura líder capaz de ejercer modulación alostérica positiva.

La **serie I** de derivados de 1,2,3-triazol incluyó compuestos con funciones fosfonato de metilo (**3a**), fosfonato de etilo (**3b**) y ácido fosfónico (**4**). Este último fue el menos eficaz, potenciando solamente el parámetro cinético más sensible, es decir, la duración de los *bursts*. Por el contrario, los dos ésteres exhibieron un efecto potenciador más pronunciado que el ácido, resultando el fosfonato de metilo más potente y eficaz que el fosfonato de etilo. Respecto del ácido fosfónico, la especie química mayoritaria bajo las condiciones experimentales evaluadas presenta una única carga neta negativa, ya que a pH fisiológico (7,4) sólo uno de los hidroxilos está ionizado, y hasta el presente no existen reportes de otras moléculas cargadas con accionar como PAMs. Es posible que esa presencia de grupos ionizados origine fuerzas electrostáticas que impidan y/o dificulten ciertas interacciones hidrofóbicas con los residuos de aminoácidos del sitio de unión alostérico, derivando en el escaso a nulo efecto observado en el compuesto 4. En contraste, los fosfonatos no presentan carga neta por poseer los átomos de oxígeno esterificados, pudiendo establecer interacciones hidrofóbicas en el sitio alostérico que tal vez sean responsables de su mayor efecto potenciador. Por otra parte, la disminución en la potenciación observada con el incremento de la longitud de la cadena alifática que esterifica los hidroxilos puede deberse a un mayor impedimento estérico, dado que la habilidad de establecer interacciones hidrofóbicas no debiera modificarse sustancialmente. Tanto el ácido fosfónico como el fosfonato de etilo potenciaron sólo a una de las concentraciones evaluadas, 10 μM y 50 μM

respectivamente, mientras que el fosfonato de metilo fue activo entre 10-100 μM . En futuros estudios sería preciso evaluar el accionar de los compuestos 3b y 4 en concentraciones más próximas a aquella donde se detectó actividad, con el objetivo de determinar con precisión el rango en el cual resultan funcionales. De todos modos, dicho rango será indudablemente más estrecho o acotado que el del compuesto 3a. Por lo tanto, dada la mayor eficacia y el amplio rango de concentraciones activas del fosfonato de metilo, se procedió a su caracterización farmacológica detallada y a la realización de estudios SAR, pues su estructura resultó ser la más promisoría para el desarrollo de agentes terapéuticos potenciales con actividad $\alpha 7$ -PAM.

Respecto de la actividad biológica se determinó que el compuesto **3a** con el grupo **fosfonato de metilo** actúa como **PAM tipo I** del receptor $\alpha 7$, ya que incrementó el pico de la **corriente macroscópica** evocada por la ACh sin disminuir significativamente el decaimiento o velocidad de desensibilización. A su vez, al igual que otros PAMs tipo I a nivel de **corrientes unitarias**, el compuesto 3a no afectó la conductancia unitaria, pero modificó la cinética del receptor, prolongando las aperturas individuales (~ 4 veces) e induciendo la activación en *bursts* compuestos por varias aperturas rápidas y sucesivas de mayor duración (~ 7 veces). En este contexto y posicionando al compuesto 3a junto a los PAMs prototipo ya descritos, se observa que el mismo fue el menos eficaz en ambos órdenes de eficacia, el basado en el pico de la corriente macroscópica (PNU-120596 > 5-HI > NS-1738 \geq **3a**) y el basado en la duración de los *bursts* de las corrientes unitarias (PNU-120596 > NS-17378 \geq 5-HI > **3a**).

También se exploraron los **determinantes estructurales de la potenciación** para el compuesto 3a, teniendo en cuenta las controversias existentes sobre los posibles sitios alostéricos en el receptor $\alpha 7$ para los PAMs tipo I. Para ello se emplearon el **receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT_{3A} HC** y el **receptor quíntuple mutante $\alpha 7$ TSLMF**. Por un lado, aunque se ha reportado que los prototipos de PAM tipo I 5-HI y NS-1738 modulan positivamente a la quimera (Grønlien *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2011b; Andersen *et al.*, 2016), el compuesto 3a fue incapaz de potenciarla, lo que sugiere un rol preponderante de la interfaz ECD-TMD o del TMD del receptor $\alpha 7$. Por otro lado, como se demostró en la parte I del presente capítulo, las cinco mutaciones transmembrana del receptor $\alpha 7$ TSLMF afectan en distinto grado a la potenciación ejercida por los diferentes tipos de PAMs, ya que el PAM tipo II PNU-120596 pierde la capacidad de potenciarlo al igual que ciertos PAMs tipo I como el NS-1738, mientras que otros PAMs tipo I, como el 5-HI, conservan su habilidad potenciadora (DaCosta *et al.*, 2011; Andersen *et al.*, 2016). En el caso del compuesto 3a, el receptor quíntuple mutante no fue potenciado, evidenciando que los residuos transmembrana constituyen determinantes estructurales de la potenciación.

En resumen, los resultados expuestos en la parte III del presente capítulo demostraron la existencia de un nuevo compuesto de origen sintético derivado del 1,2,3-triazol que actúa como PAM tipo I del receptor $\alpha 7$, exhibiendo perfiles de corrientes macroscópicas y unitarias compatibles con su clasificación. Sin embargo, también comparte determinantes estructurales de potenciación a nivel transmembrana con los PAMs tipo II, semejando el comportamiento observado sólo en algunos PAMs tipo I previamente descritos, como el NS-1738 y los flavonoides. Esto nuevamente reafirma la complejidad de la modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7$, sosteniendo la importancia de complementar el análisis a nivel macroscópico con el microscópico.

Una vez identificado y caracterizado un compuesto con actividad biológica, como es el caso del compuesto 3a, los **estudios SAR** permiten establecer los grupos funcionales asociados a la presencia o ausencia de dicho efecto de interés. Las modificaciones realizadas sobre el compuesto 3a dadas por el acortamiento de la distancia triazol-grupo arilo, el alargamiento de la distancia triazol-grupo fosfonato y la variación del grupo arilo de naftaleno a benceno resultaron deletéreas para la actividad $\alpha 7$ -PAM. Nuevas posibles modificaciones a realizar en futuros estudios podrían evaluar un alargamiento de la cadena en la distancia triazol-grupo arilo, ya que sólo se consideró un acortamiento que extendiera la conjugación del anillo aromático, y tal vez un menor grado de conjugación y una mayor libertad de movimiento resultarían más óptimos para la actividad PAM. Respecto del núcleo aromático sólo se consideró un grupo de menor tamaño (benceno), por lo cual se podría evaluar la presencia de grupos aromáticos de mayor tamaño, incluso policíclicos como fenantreno o antraceno. Únicamente la inversión de los sustituyentes sobre el anillo de triazol permitió que el compuesto 8 retuviera el efecto potenciador, aunque el mismo disminuyó ligeramente con respecto al de la estructura original. Es probable que la retención de la actividad biológica en este fosfonato con triazol invertido se deba a que la disposición estérica de los sustituyentes sobre el anillo de triazol sigue siendo la misma, sólo que el grupo arilo pasó a sustituir al metilo de la posición 4 y el grupo fosfonato al de la posición 1.

Estos resultados se encuentran en concordancia con reportes previos sobre la enorme diversidad estructural de los PAMs, donde se ha demostrado que mínimos cambios en la estructura química de un modulador resultan en dramáticas diferencias en las propiedades farmacológicas, pudiendo interconvertirse en agonistas alostéricos, SAMs y NAMs (Gill *et al.*, 2011, 2015). En este caso, partiendo del compuesto 3a con actividad $\alpha 7$ -PAM se obtuvieron los compuestos 5, 6 y 7 que presuntamente actúan como SAMs, sin efecto detectable, pero siendo capaces de unirse al sitio alostérico. Sin embargo, no es posible descartar que las modificaciones químicas sobre los compuestos hayan provocado directamente una pérdida de su capacidad de unión al sitio alostérico, en cuyo caso tampoco se detectaría efecto alguno a nivel electrofisiológico. Si bien los estudios SAR apuntan a mejorar la potencia, eficacia y selectividad de los compuestos químicos sintetizados, los cambios

estructurales llevados a cabo en la presente parte del capítulo I sólo condujeron a la obtención de compuestos sin actividad biológica o con un grado de actividad similar a la del compuesto de partida. El número de modificaciones posibles a realizar sobre una estructura es prácticamente ilimitado, por lo cual deberían aplicarse nuevas estrategias de SAR que conduzcan a compuestos con propiedades farmacológicas más promisorias a nivel terapéutico. Una vez identificados estos compuestos se requerirán estudios *in vitro* más exhaustivos acerca de la eficacia, potencia y selectividad sobre otros receptores, particularmente otros subtipos de nAChRs, para decidir si amerita o no continuar con la realización de ensayos *in vivo*.

El novedoso descubrimiento de la actividad α 7-PAM de los **derivados de 1,2,3-triazol 1,4 disustituídos con grupos arilo y fosfonato**, particularmente del **compuesto 3a** con fosfonato de metilo, se adiciona a la enorme diversidad estructural ya reportada entre los moduladores alostéricos. En el contexto de los ligandos de los nAChRs sólo existe un reporte sobre la presencia del isómero 1,2,4-triazol en una serie de PAMs denominados “TBS”, en referencia al triazol y a la benzosulfonamida de la estructura (Chatzidaki *et al.*, 2015). En contraste, el isómero **1,2,3-triazol** fue por primera vez explorado en el presente trabajo de tesis. Las características que tornan a los triazoles muy dúctiles en química medicinal incluyen la formación de interacciones puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo y π - π con diversos blancos biológicos; la estabilidad frente a hidrólisis, degradación metabólica y condiciones redox; y la solubilidad en solución acuosa (Dheer *et al.*, 2017). Es así que se han reportado compuestos de triazol con gran variedad de funciones biológicas, incluyendo antibióticos, antivirales, antiparasitarios, antifúngicos, analgésicos, antiinflamatorios, anestésicos, anticonvulsivantes, antiproliferativos, antihistamínicos, etc. (Kharb *et al.*, 2011; Sahu *et al.*, 2013; Dheer *et al.*, 2017; Bozorov *et al.*, 2019). Otra particularidad llamativa es que el agregado de sustituyentes en las posiciones 1 y 4 del anillo de triazol da lugar, en términos de distancia y planaridad, a bioisómeros no clásicos del grupo amida, uno de los más frecuentes entre los fármacos bioactivos (Massarotti *et al.*, 2014; Dheer *et al.*, 2017). Por esta razón se decidió sintetizar la serie de **derivados de 1,2,3-triazol 1,4-disustituídos**, y emplear como sustituyentes **grupos arilo**, extensamente presentes en PAMs prototipo, y **grupos fosfonato**, inexplorados en el ámbito de los ligandos de los nAChRs. Las propiedades biológicas únicas de los fosfonatos radican en la posesión de un enlace fósforo-carbono (P-C) de alta estabilidad, resistente a la hidrólisis y capaz de mimetizar los enlaces fósforo-oxígeno de los fosfatos y carbono-oxígeno de los carboxilatos en las moléculas endógenas (Yu *et al.*, 2013; Horsman y Zechel, 2017; Petkowski *et al.*, 2019). Estas características les permiten ejercer una amplia gama de actividades biológicas, formando parte de antibióticos, antivirales, fármacos anticancerosos, agentes antirreabsortivos óseos, inhibidores de enzimas, etc. (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Metcalf y van der Donk, 2009; Martin *et al.*, 2015; Horsman y Zechel, 2017). Si bien no existen reportes de PAMs

con fosfonatos en su estructura como se mencionó previamente, han sido descritos en numerosos inhibidores de la AChE (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Horsman y Zechel, 2017). Casualmente, estudios independientes han demostrado la capacidad de algunos inhibidores de la AChE de interactuar de forma alostérica directa sobre distintos nAChRs, en particular actuando como PAMs (Okonjo *et al.*, 1991; Schratzenholz *et al.*, 1996; Maelicke *et al.*, 2000, 2001; Samochocki *et al.*, 2003). Un claro ejemplo es la galantamina, uno de los primeros PAMs reportados para $\alpha 7$ y con sitio alostérico identificado en el ECD (Samochocki *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2010), aunque estudios recientes se oponen a dichas observaciones (Kowal *et al.*, 2018). Este inhibidor actúa como PAM a bajas concentraciones, pero por encima de 10 μM comienza a ejercer un efecto negativo sobre el receptor (Samochocki *et al.*, 2003), probablemente por bloqueo de canal abierto, tal como se observó en algunos de los derivados con fosfonato evaluados en la presente parte del capítulo I. Estos antecedentes sustentan la elección de los grupos fosfonato como sustituyentes para el heterociclo de triazol, ya que no han sido explorados previamente y su potencial efecto inhibitor de la AChE les otorgaría también un potencial accionar como ligando alostérico directo de los nAChRs.

En síntesis, el **receptor nicotínico $\alpha 7$** ejerce un rol clave en cognición, memoria, aprendizaje, neuroprotección y antiinflamación, por ello su **modulación alostérica positiva** surge como una **estrategia terapéutica** prometedora para los desórdenes neurológicos e inflamatorios donde la señalización colinérgica resulta deficiente. De este modo, el desarrollo de nuevos PAMs resulta crucial y la síntesis química constituye una de las vías de obtención que más ventajas ofrece, pues permite proveer compuestos prototipo sobre los cuales modificar grupos funcionales para mejorar la actividad biológica en términos de eficacia, potencia y selectividad, disminuyendo los efectos adversos. Los resultados aquí expuestos revelaron que una novedosa serie de **derivados de 1,2,3-triazol 1,4-disustituidos** con **grupos arilo y fosfonato** exhiben **actividad $\alpha 7$ -PAM**, siendo particularmente el compuesto funcionalizado con **fosfonato de metilo** el de mayor eficacia. Se descifró su mecanismo molecular de acción, clasificándolo como PAM tipo I con determinantes estructurales de potenciación a nivel transmembrana, y fue sometido a diversas modificaciones químicas. Estos hallazgos permiten proponer a este compuesto como un nuevo farmacóforo de interés, que además de ser promisorio por sí mismo como PAM de $\alpha 7$, también resulta útil como estructura plataforma, contribuyendo así al diseño, desarrollo y optimización de nuevos agentes sintéticos potencialmente terapéuticos.

CONCLUSIONES PARCIALES: CAPÍTULO I

Parte I: Mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica

- La **activación ortostérica** del receptor $\alpha 7$ homomérico por la ACh se caracteriza a nivel de corrientes macroscópicas por una rápida cinética de activación y desensibilización, y a nivel de corrientes unitarias por aperturas breves y aisladas, infrecuentemente agrupadas en *bursts*. La brevedad del tiempo de estado abierto del canal dificulta la resolución de su amplitud máxima.

- La **activación alostérica** del receptor $\alpha 7$ homomérico por el agonista alostérico 4BP-TQS se caracteriza por una cinética de activación y desensibilización notoriamente lenta a nivel de corrientes macroscópicas, y por aperturas prolongadas, agrupadas en episodios de activación sostenidos de muy larga duración denominados *clusters*, a nivel de corrientes unitarias. La mayor duración de los eventos de apertura permite la completa resolución de la amplitud.

- La **modulación alostérica positiva** del receptor $\alpha 7$ homomérico por los prototipos de PAMs tipo I y II presenta distintos perfiles:

- A nivel de **corrientes macroscópicas** se incrementa el pico de la corriente evocada por la ACh, con mínimos o nulos cambios en la desensibilización en el caso de los PAMs tipo I, o con una profunda reducción en la velocidad de desensibilización y/o un aumento en la reactivación desde el estado desensibilizado en el caso de los PAMs tipo II.

- A nivel de **corrientes unitarias** se modifica la cinética del receptor mediante la prolongación del tiempo de estado abierto y la inducción de episodios de activación sostenidos, de duración moderada o *bursts* en el caso de los PAMs tipo I, o de muy larga duración o *clusters*, en el caso de los PAMs tipo II. Los PAMs no afectan la conductancia unitaria, sino que sólo favorecen la resolución de la máxima amplitud.

- A **mayor temperatura** la potenciación disminuye, pero continúa siendo significativa. A nivel de canal único se observa un modesto aumento de la amplitud y una **sensibilidad diferencial** de ambos tipos de PAMs con respecto a las duraciones de las aperturas y de los episodios de activación sostenidos. Para los PAMs tipo I se mantienen constantes, disminuyendo sólo en frecuencia; mientras que para los PAMs tipo II se reducen notoriamente, desapareciendo los *clusters* de muy larga duración. El parámetro cinético más sensible a la temperatura resulta ser entonces la duración de los episodios de activación sostenida.

- Los **determinantes estructurales transmembrana** influyen en la modulación por PAMs tipo I y II, aunque de forma diferencial. Al estar mutados estos residuos, los PAMs tipo II pierden por completo su grado de potenciación, mientras que los PAMs tipo I exhiben dos comportamientos posibles, algunos pierden su actividad potenciadora de forma semejante a los PAMs tipo II, y otros logran conservarla, siendo más resistentes a dichos determinantes.

Parte II: Modulación alostérica por flavonoides

- Los flavonoides son compuestos naturales que actúan como PAMs tipo I del receptor $\alpha 7$.
- Compuestos prototipo de las tres clases de flavonoides (isoflavonoides, flavonoides y neoflavonoides) exhiben dicha actividad, siendo el orden de eficacia de potenciación Gen > Que \geq Neo.
- La potenciación por los flavonoides, pese a ser estos PAMs tipo I, es sensible a los determinantes estructurales transmembrana, asemejándose al comportamiento de los PAMs tipo II.
- La actividad $\alpha 7$ -PAM de los flavonoides también se observa a nivel metabotrópico, potenciando la reducción de los niveles intracelulares de ROS mediada por $\alpha 7$. Esto constituye un mecanismo adicional por el cual estos compuestos naturales ejercen su efecto antioxidante y neuroprotector.

Parte III: Modulación alostérica por derivados de 1,2,3-triazol funcionalizados con grupos fosfonato

- Una novedosa serie de derivados sintéticos de 1,2,3-triazol 1,4-disustituidos con grupos arilo y fosfonato exhibe actividad $\alpha 7$ -PAM, siendo el compuesto funcionalizado con fosfonato de metilo el de mayor eficacia como PAM tipo I.
- La potenciación por el derivado de 1,2,3-triazol, pese a ser este un PAM tipo I, es sensible a los determinantes estructurales transmembrana, asemejándose al comportamiento de los PAMs tipo II.
- De los distintos estudios SAR efectuados sobre la estructura del derivado de 1,2,3-triazol, sólo la inversión de la geometría del triazol permite conservar la actividad $\alpha 7$ -PAM.

En el **capítulo I** se dilucidaron los mecanismos de acción de los procesos de activación y modulación alostérica positiva del **receptor $\alpha 7$ homomérico** a nivel molecular. Para ello se evaluaron agonistas ortostéricos y alostéricos, y distintos tipos de PAMs, incluyendo compuestos prototipo ya reportados, y compuestos novedosos, de origen natural como los flavonoides, y de origen sintético como los derivados de 1,2,3-triazol funcionalizados con grupos fosfonato. Esta información contribuye a comprender el origen molecular diferencial del accionar de los ligandos ortostéricos y alostéricos, los cuales pueden incrementar la probabilidad de apertura, disminuir la velocidad de desensibilización, recuperar receptores desde el estado desensibilizado, etc., predominando uno u otro mecanismo, o una combinación de los mismos, dando lugar a infinitas posibilidades de perfiles de corrientes unitarias. La complejidad de la modulación farmacológica del receptor $\alpha 7$ es tal que no puede ser simplificada o reducida a sólo dos categorías, lo cual resalta la importancia y la necesidad de complementar el análisis a nivel macroscópico con el microscópico, para obtener una aproximación más certera de los mecanismos moleculares de acción y contribuir así al desarrollo y optimización de ligandos potencialmente terapéuticos.

CAPÍTULO II

ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DE RECEPTORES $\alpha 7$ HETEROMÉRICOS



CAPÍTULO II

ACTIVACIÓN Y MODULACIÓN DE RECEPTORES $\alpha 7$ HETEROMÉRICOS

INTRODUCCIÓN

La señalización colinérgica en el SNC mediada por los receptores nicotínicos se da mayoritariamente a través de dos subtipos de receptores, los **heteroméricos $\alpha 4\beta 2$** y el **homomérico $\alpha 7$** , los cuales exhiben un **patrón temporal y espacial distintivo**, de acuerdo a sus **propiedades funcionales diferenciales**. De acuerdo a la regla clásica de ensamblaje de los nAChRs, la subunidad $\alpha 7$ únicamente se ha considerado capaz de formar receptores homoméricos con cinco subunidades idénticas. Además, su origen evolutivo más ancestral se encuentra en línea con dicha capacidad, puesto que la diversificación de subunidades en principales y complementarias ocurre posteriormente en el curso de la evolución, dando lugar a los receptores heteroméricos. Tanto es así que el receptor $\alpha 7$ homomérico ha sido el foco de interés de numerosos estudios, no sólo por su abundante presencia en hipocampo, corteza, tálamo y zonas límbicas subcorticales (Albuquerque *et al.*, 2009; Lendvai *et al.*, 2013; Bouzat *et al.*, 2018), sino también por su reconocida implicancia en procesos fisiológicos y patológicos que lo convierten en un promisorio blanco farmacológico.

Sin embargo, recientemente se ha confirmado que la subunidad $\alpha 7$ también es capaz de coensamblarse con subunidades $\beta 2$ formando **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$** funcionales, presentes en áreas discretas del cerebro (Liu *et al.*, 2009, 2012; Moretti *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Hasta la actualidad se desconocen las estequiometrías de estos receptores heteroméricos, así como sus propiedades funcionales y su rol fisiológico diferencial con respecto a la contraparte homomérica. Los únicos reportes existentes a nivel de corrientes macroscópicas evidencian algunos resultados controversiales (Liu *et al.*, 2009, 2012; Murray *et al.*, 2012; Mowrey *et al.*, 2013; Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015).

Por otra parte, ciertos resultados experimentales sugieren la existencia de **receptores $\alpha 7$ heteroméricos funcionales** originados a partir del coensamblaje con otras subunidades α y β además de $\beta 2$, tales como **$\alpha 5$, $\beta 3$ y $\beta 4$** , pese a que su presencia no ha podido ser demostrada en sistemas nativos hasta el momento (Yu y Role, 1998a; b; Palma *et al.*, 1999; Virginio *et al.*, 2002; El-Hajj *et al.*, 2007; Criado *et al.*, 2012; Lansdell *et al.*, 2012). Llamativamente, es posible establecer un paralelismo entre $\alpha 7$ y $\alpha 4$ como subunidades principales, puesto que esta última tradicionalmente forma receptores heteroméricos con $\beta 2$ y $\beta 4$ como subunidades complementarias, y con $\alpha 5$ como subunidad accesoria, aunque a diferencia de $\alpha 7$, carece de la capacidad de formar receptores homoméricos. Además, dado el origen evolutivo ancestral de los receptores homoméricos como $\alpha 7$, la incorporación de otras subunidades en el pentámero generando distintas estequiometrías debe haber impactado en la función molecular de dicho receptor durante la evolución, tornándolo óptimo para desempeñar su

rol modulador en circuitos neuronales específicos de acuerdo con su localización anatómica discreta. Cabe destacar que del total de receptores heteroméricos neuronales del SNC, $\alpha 7\beta 2$ sólo constituye una pequeña fracción, mientras que aquellos con $\alpha 4$ como subunidad principal continúan siendo los más abundantes.

En el presente capítulo de tesis se aborda el estudio de los **mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica de los receptores $\alpha 7$ heteroméricos**, particularmente de los receptores **$\alpha 7\beta 2$** , cuya existencia en sistemas nativos ha sido fehacientemente demostrada, y de los receptores **$\alpha 7\beta 4$** de estequiometrías análogas, con el objetivo de contribuir a la dilucidación del **rol e impacto diferencial de la incorporación de distintas subunidades β** en el pentámero de $\alpha 7$ y en sus propiedades funcionales (Figura II.1). De este modo, los resultados aquí expuestos contribuyen al desciframiento de las bases moleculares distintivas de la actividad de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos, con su potencial impacto en la neuromodulación ejercida por la señalización colinérgica que median en el SNC.

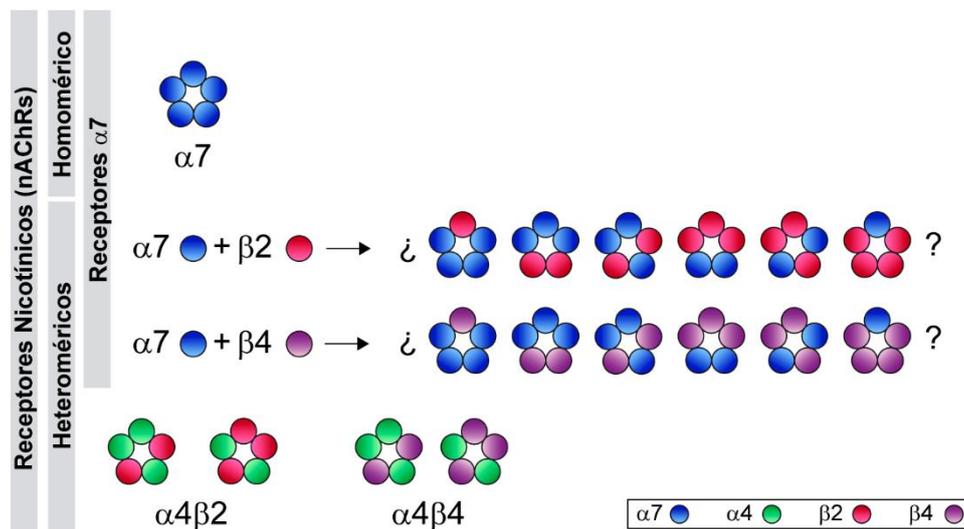


Figura II.1. Estequiometrías posibles de nAChRs homoméricos y heteroméricos formados por subunidades principales $\alpha 7$ o $\alpha 4$, y subunidades complementarias $\beta 2$ o $\beta 4$. Se muestran los esquemas de los receptores $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$, cuyas estequiometrías ya han sido caracterizadas, y con signos de interrogación se observan los esquemas de las estequiometrías que podrían originarse por combinación de la subunidad $\alpha 7$ con las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$. Estas posibles estequiometrías serán exploradas en el presente capítulo de tesis. Las referencias de color para cada subunidad se indican en el recuadro de la porción inferior derecha.

OBJETIVOS GENERALES

Dada la capacidad de la subunidad $\alpha 7$ para formar no sólo receptores homoméricos sino también heteroméricos de rol fisiológico aún desconocido, en el capítulo II de la presente tesis se establecen los siguientes objetivos generales:

- Identificar las estequiometrías funcionales del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$.
- Dilucidar el rol y la contribución de la subunidad $\beta 2$ en el pentámero de $\alpha 7$ determinando así las propiedades funcionales diferenciales del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$.
- Dilucidar y contrastar los mecanismos de activación ortostérica y alostérica del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor homomérico $\alpha 7$.
- Dilucidar y contrastar los mecanismos de modulación alostérica por los distintos tipos de PAMs sobre el receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor homomérico $\alpha 7$.
- Dilucidar el rol y la contribución de distintas subunidades β en el pentámero de $\alpha 7$ al contrastar las propiedades funcionales de receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 4$ y $\alpha 7\beta 2$ de estequiometrías análogas.

CAPÍTULO II: Activación y modulación de receptores $\alpha 7$ heteroméricos

Antecedentes y objetivos específicos

Tradicionalmente, la subunidad $\alpha 7$ ha sido considerada capaz de formar sólo receptores homoméricos, aunque estudios recientes confirman la presencia de un grupo minoritario de **receptores $\alpha 7$ heteroméricos** en el SNC, dados por el coensamblaje con subunidades $\beta 2$, denominados **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$** (Liu *et al.*, 2009, 2012; Moretti *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Las sospechas acerca de su existencia habían surgido tempranamente a partir de diversos trabajos de investigación. Por un lado, se habían reportado diferencias farmacológicas entre el receptor $\alpha 7$ homomérico expresado en ovocitos y los receptores $\alpha 7$ nativos en cerebro de aves, indicando que estos últimos podían ser heteroméricos (Anand *et al.*, 1993). Al utilizar preparaciones presinápticas se identificaron fracciones afines a la α -Bgt con sensibilidad variable, sugiriendo la presencia de distintos subtipos de receptores conteniendo la subunidad $\alpha 7$ (McGehee *et al.*, 1995). Finalmente se obtuvo evidencia sobre la expresión de receptores $\alpha 7$ heteroméricos funcionales en neuronas del SNP simpático de aves (Yu y Role, 1998a). Por otro lado, si bien al analizar la distribución de las subunidades nicotínicas en neuronas hipocampales de rata en cultivo se observó un predominio de $\alpha 7$ en terminales presinápticos, y de $\beta 2$ en soma y procesos proximales, también en ciertas áreas del cuerpo neuronal se evidenció la colocalización de ambas subunidades (Zarei *et al.*, 1999). Otro estudio analizó la distribución de los ARN mensajeros de las subunidades nicotínicas en las neuronas del cerebro anterior basal de rata, detectando una colocalización para $\alpha 7$ y $\beta 2$ en la mayoría de las neuronas colinérgicas y GABAérgicas, mientras que $\alpha 4$ sólo se identificó en subpoblaciones neuronales específicas y no obligadamente en todas las áreas que expresaban $\beta 2$ (Azam *et al.*, 2003). Luego se demostró la formación de receptores $\alpha 7\beta 2$ funcionales por coexpresión de las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ individuales de rata, ratón y/o humano utilizando ovocitos de *Xenopus* y/o distintas líneas celulares humanas como sistemas de expresión heterólogos (Khiroug *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2012; Mowrey *et al.*, 2013; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Incluso se observó la coimmunoprecipitación de ambas subunidades (Khiroug *et al.*, 2002) y su colocalización por técnicas de microscopía de fluorescencia en líneas celulares humanas (Murray *et al.*, 2012). Finalmente, la funcionalidad de los presuntos receptores $\alpha 7\beta 2$ también fue determinada en sistemas nativos de mamíferos, incluyendo neuronas de rata en cerebro anterior basal e hipocampo (Liu *et al.*, 2009, 2012; Mowrey *et al.*, 2013).

El rol fisiológico diferencial de este receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ aún no ha sido dilucidado, si bien su presencia en áreas específicas y discretas del cerebro relacionadas con cognición y memoria permiten asociarlo a dichos procesos fisiológicos. Su localización ha sido confirmada en cerebro anterior basal (humano y murino) y corteza cerebral (murina y en particular corteza temporal humana), mientras que existen controversias acerca de su presencia en el hipocampo, ya que sólo ha sido

detectado en ratas recién nacidas y no en adultas (Introducción, Pág. 26, Fig. 11) (Liu *et al.*, 2009, 2012; Mowrey *et al.*, 2013; Moretti *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Además, se ha propuesto un posible rol del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ en procesos terapéuticos y patológicos como la anestesia y la enfermedad de Alzheimer respectivamente (Liu *et al.*, 2009, 2012, 2013; Mowrey *et al.*, 2013). En cuanto a sus propiedades funcionales, los receptores $\alpha 7\beta 2$ han sido poco explorados, únicamente a nivel de corrientes macroscópicas, tanto en sistemas de expresión nativos como heterólogos (Liu *et al.*, 2009, 2012; Murray *et al.*, 2012; Mowrey *et al.*, 2013; Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Si bien la mayoría de los estudios sugieren un perfil farmacológico y funcional diferencial del receptor $\alpha 7\beta 2$ con respecto al del receptor homomérico, las distinciones entre ambos no han sido totalmente esclarecidas por algunos hallazgos contradictorios (revisados en (Wu *et al.*, 2016)). Estos tienen su origen en la limitada información provista por estos reportes, ya que los datos experimentales proceden de poblaciones mixtas de receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos, dada la carencia de un control preciso y fehaciente de la estequiometría de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$.

Si bien $\alpha 7\beta 2$ es el único subtipo de receptor $\alpha 7$ heteromérico identificado hasta la actualidad en sistemas nativos, diversas evidencias en sistemas heterólogos indican que $\alpha 7$ también posee la capacidad de coensamblarse con otras subunidades, tales como $\alpha 5$, $\beta 3$ y $\beta 4$ (Yu y Role, 1998a; b; Palma *et al.*, 1999; Virginio *et al.*, 2002; El-Hajj *et al.*, 2007; Criado *et al.*, 2012; Lansdell *et al.*, 2012). Uno de estos estudios propone una asociación directa de $\alpha 7$ con la **subunidad $\beta 4$** (Criado *et al.*, 2012), siendo este potencial coensamblaje de gran interés, pues $\alpha 7$ podría formar **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 4$** y $\alpha 7\beta 2$, de forma análoga a la subunidad $\alpha 4$ que genera receptores $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$. Aunque $\beta 2$ es la subunidad complementaria mayoritaria en el SNC, se ha detectado la presencia del ARN mensajero de $\beta 4$ colocalizando con la subunidad $\alpha 4$ en hipocampo, corteza, habénula medial y cerebelo entre otras áreas del encéfalo (Dineley y Patrick, 1992), por lo cual se postula que el receptor $\alpha 4\beta 4$ también ejerce un rol funcional importante en las respuestas comportamentales y en la dependencia a nicotina junto con $\alpha 4\beta 2$ (Stauderman *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2006). Además, se han generado ratones *knock-out* para las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ individualmente que resultaron viables (Picciotto *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1999), mientras que los ratones nulos para ambas exhiben disfunción multiorgánica y alta tasa de mortalidad, revelando una redundancia parcial entre las dos subunidades β (Xu *et al.*, 1999). Por lo tanto, pese a las notorias diferencias entre las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ con respecto a su capacidad para formar receptores homoméricos, es factible considerar cierto paralelismo entre las mismas actuando como subunidades principales de receptores heteroméricos, puesto que ya se ha confirmado la habilidad de $\alpha 7$ para ensamblarse con $\beta 2$ de forma fisiológica, y las evidencias en sistemas heterólogos apuntan a que el coensamblaje con $\beta 4$ puede resultar funcional *in vivo* (Criado *et al.*, 2012).

Por estas razones, en el capítulo II de la presente tesis se evalúan las bases moleculares diferenciales de la **activación y modulación alostérica de los receptores $\alpha 7$ heteroméricos** con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico clásico, con el objetivo de dilucidar sus propiedades funcionales distintivas y el impacto de la presencia de distintas subunidades β en el pentámero de $\alpha 7$. Los receptores $\alpha 7$ heteroméricos evaluados fueron principalmente el **receptor $\alpha 7\beta 2$** , y en menor medida el **receptor $\alpha 7\beta 4$** , únicamente con fines comparativos, puesto que hasta el momento no existen reportes acerca de su existencia en sistemas nativos.

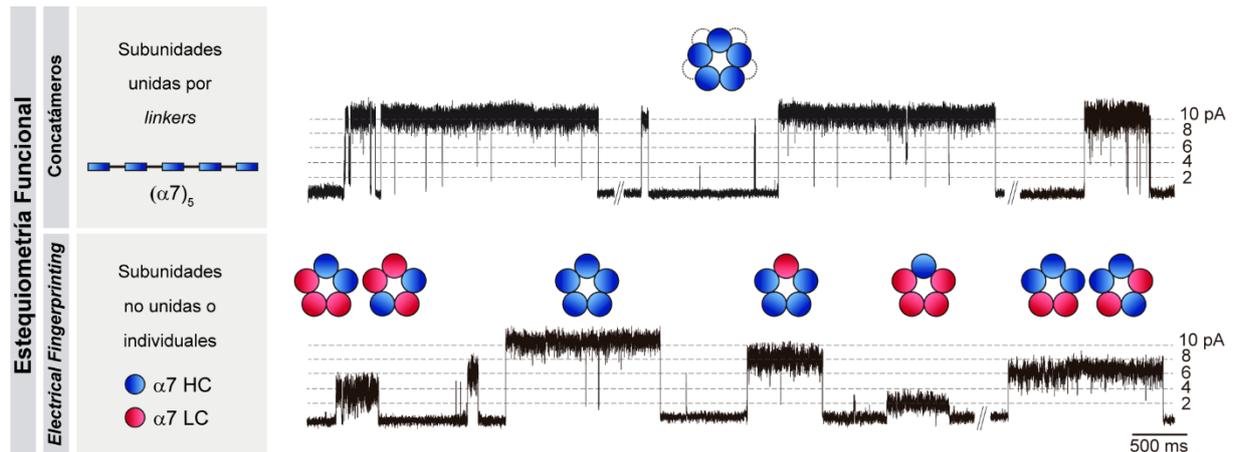


Figura II.2. Estrategias utilizadas para la determinación de la estequiometría funcional de los nAChRs. Se muestran registros representativos de corrientes unitarias obtenidas por cada estrategia en presencia de ACh 100 μ M y PNU-120596 1 μ M como ejemplo. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV.

Porción superior: mediante el uso de concatámeros se observa una única población de amplitud correspondiente a la estequiometría fijada por el receptor concatamérico.

Porción inferior: mediante la técnica de *electrical fingerprinting*, la combinación de subunidades HC y LC da lugar a diversas estequiometrías, cada una con una amplitud característica que permite su identificación.

Inicialmente se identificaron las **estequiometrías funcionales** del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ realizando registros electrofisiológicos a nivel de corrientes unitarias mediante dos estrategias: la **tecnología de concatámeros** y la **técnica de *electrical fingerprinting*** (Figura II.2). Por un lado, el uso de los receptores concataméricos conformados por subunidades enlazadas por *linkers* peptídicos permite el control de la estequiometría restringiendo la expresión a un solo receptor con un único ordenamiento de subunidades (Carbone *et al.*, 2009; Mazzaferro *et al.*, 2011, 2017; Bouzat *et al.*, 2018). Por otro lado, la técnica de *electrical fingerprinting* (huella dactilar eléctrica) utilizando diversas combinaciones de subunidades no enlazadas de alta y baja conductancia permite correlacionar las distintas amplitudes con las diferentes estequiometrías de los receptores (Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2011, 2013; DaCosta *et al.*, 2015; Bouzat *et al.*, 2018). En este caso se emplearon subunidades $\beta 2$ WT con subunidades $\alpha 7$ LC, portando tres mutaciones a arginina en los residuos del ICD que afectan la conductancia unitaria (Q428R, E432R, S436R), de modo tal que forman canales funcionales, pero con amplitudes indetectables a nivel de los registros de canal único (Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*,

2011, 2013; DaCosta y Sine, 2013; DaCosta *et al.*, 2015). Finalmente, tras identificar las estequiometrías de los receptores $\alpha 7\beta 2$ funcionales se diseñaron concatámeros $\alpha 7\beta 4$ de ordenamientos análogos con fines comparativos.

Los resultados presentados en este capítulo permiten delinear el perfil funcional diferencial de los receptores $\alpha 7$ heteroméricos con respecto al del clásico receptor $\alpha 7$ homomérico, contribuyendo al entendimiento de su impacto a nivel espaciotemporal en los procesos de señalización colinérgica que median neuromodulación en regiones específicas del SNC y, por ende, a la dilucidación de su rol fisiológico y fisiopatológico aún desconocido. Por lo tanto, se plantean los siguientes **objetivos específicos del capítulo II:**

- Identificar las estequiometrías funcionales de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ mediante el uso de concatámeros y de la técnica de *electrical fingerprinting*.
- Describir y comparar a nivel de corrientes macroscópicas y unitarias la activación ortostérica por ACh de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor homomérico $\alpha 7$.
- Identificar el rol y la contribución del distinto número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero a nivel de la cinética del receptor y de su conductancia unitaria.
- Describir y comparar a nivel de corrientes unitarias la activación alostérica por el agonista 4BP-TQS de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor homomérico $\alpha 7$.
- Describir y comparar a nivel de corrientes macroscópicas y unitarias la modulación alostérica por PAMs tipo I y II de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor homomérico $\alpha 7$.
- Describir y comparar a nivel de corrientes unitarias la activación ortostérica por ACh de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 4$ con respecto al receptor homomérico $\alpha 7$.
- Determinar el impacto diferencial de la presencia de subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ en el pentámero de $\alpha 7$ a nivel cinético y de conductancia unitaria, mediante la caracterización de receptores $\alpha 7\beta 4$ y $\alpha 7\beta 2$ de estequiometrías análogas.

Resultados

1. RECEPTORES HETEROMÉRICOS $\alpha 7\beta 2$

1.1. Receptores concataméricos o concatámeros

La primera estrategia experimental utilizada para la determinación de las estequiometrías funcionales del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ fue el uso de **receptores concataméricos o concatámeros** (Figura II.3, Metodología, Págs. 42-46). Estos receptores presentan las cinco subunidades proteicas covalentemente unidas desde el extremo C-terminal de una subunidad hasta el extremo N-terminal de la subunidad adyacente mediante *linkers* peptídicos de AGS, permitiendo el control del arreglo espacial de las subunidades y de las estequiometrías de los receptores.

Se construyeron diversos concatámeros con varios ordenamientos de subunidades, pero sólo algunos de ellos resultaron funcionales (Figura II.3). También se generaron los concatámeros $\alpha 7\beta 2$ L9'T de estequiometrías análogas, portando la mutación L9'T en las subunidades $\beta 2$ (Figura II.3). Para la realización de los experimentos se utilizaron ovocitos de *Xenopus laevis* y células BOSC23 como sistemas de expresión heterólogos. Dada la baja tasa de expresión intrínseca de los concatámeros en comparación a las subunidades no concatenadas, en el caso de los ovocitos se inyectó el ARNc de los mismos en el citoplasma para favorecer su expresión y obtener los registros de corrientes macroscópicas a través de los cuales se verificó la funcionalidad de los ordenamientos. Por su parte, para el registro de corrientes unitarias en células BOSC23, los ADNc de los concatámeros fueron cotransfectados con el ADNc de las chaperonas específicas (concatámero : Ric-3 en relación 1 : 4, o la combinación concatámero : Ric-3 : NACHO en relación 1 : 1 : 1) para posibilitar su expresión en la membrana celular.

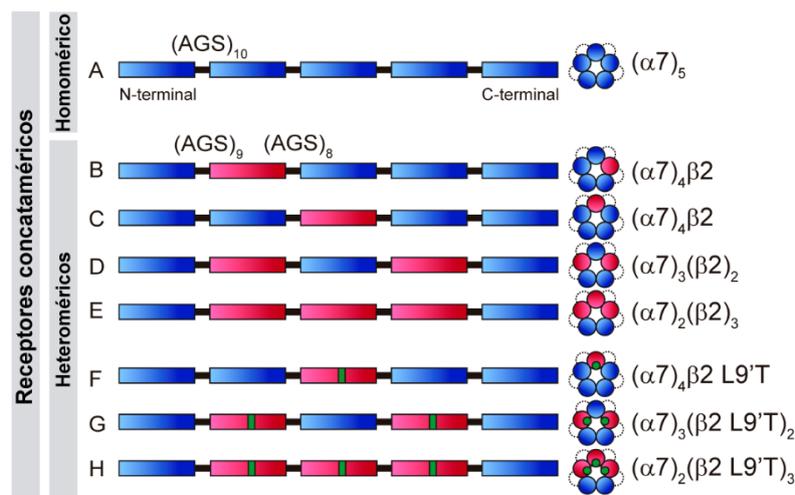


Figura II.3. Diagrama esquemático de los constructos concatenados pentaméricos. Las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ se muestran en color azul y rojo respectivamente, con la mutación L9'T del segmento M2 en verde. A la izquierda se observan los constructos lineales y a la derecha los concatámeros ensamblados junto con la denominación correspondiente. Los *linkers* peptídicos de AGS se muestran como líneas negras sólidas o punteadas.

1.1.1. Activación y modulación alostérica del concatámero $\alpha 7$

Inicialmente se construyó el concatámero ($\alpha 7$)₅, constituido por cinco subunidades $\alpha 7$ idénticas unidas mediante *linkers* peptídicos de diez repeticiones AGS cada uno (Figura II.3A). Su activación y modulación alostérica fueron caracterizadas a nivel de corrientes macroscópicas y unitarias con el objetivo de comparar sus propiedades con las del receptor $\alpha 7$ homomérico formado por subunidades no concatenadas.

Respecto de la **activación ortostérica**, se obtuvieron las **corrientes macroscópicas** a partir de ovocitos de *Xenopus* expresando el receptor ($\alpha 7$)₅ por TEVC manual, a un potencial de membrana de -60 mV para un rango de $0,1 \mu\text{M}$ - 1 mM de ACh. La curva de concentración-respuesta para el receptor concatamérico ($\alpha 7$)₅ en presencia del agonista endógeno no exhibió diferencias con la del receptor $\alpha 7$, siendo las $CE_{50} \sim 100 \mu\text{M}$ ($p > 0,05$, Figura II.4A, Tabla II.1). Se realizaron también registros de **corrientes unitarias** del receptor ($\alpha 7$)₅ por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* y a -70 mV de potencial de membrana, en presencia de ACh 100 - $500 \mu\text{M}$. Más allá de la menor frecuencia de las aperturas dada por la baja expresión del concatámero, el canal se activó dando lugar a aperturas individuales breves ($\sim 0,25$ ms) y *bursts* infrecuentes ($\sim 0,33$ ms), cuyas duraciones no exhibieron diferencias significativas con las del receptor $\alpha 7$ homomérico salvaje ($p > 0,05$ en cada caso, Figura II.4B, Tabla II.2). Tanto el histograma de estado abierto como el de *bursts* se ajustaron con dos componentes exponenciales, y el $\tau_{\text{crítico}}$ fue determinado a partir de la intersección entre el primer y segundo componentes del histograma de estado cerrado (~ 200 - $400 \mu\text{s}$). Del mismo modo, ambos receptores mostraron una distribución variable de amplitudes por la falta de resolución temporal de los eventos breves, siendo la máxima amplitud de ~ 10 pA (Figura II.4B).

Respecto de la **modulación alostérica positiva**, se construyeron las curvas de concentración-respuesta a partir de las **corrientes macroscópicas** de ACh $30 \mu\text{M}$ (CE_{20}) potenciadas por distintas concentraciones del 5-HI (prototipo de PAM tipo I) y del PNU-120596 (prototipo de PAM tipo II) para el receptor concatamérico ($\alpha 7$)₅ y se compararon con las del receptor $\alpha 7$ homomérico. Los valores de CE_{50} para ambos PAMs no mostraron diferencias significativas entre el receptor concatamérico y el compuesto por subunidades no concatenadas ($p > 0,05$ en cada caso, Figura II.4A, Tabla II.1). Del mismo modo, el perfil de las **corrientes unitarias** potenciadas por PAMs fue similar para el receptor ($\alpha 7$)₅ y el receptor $\alpha 7$, como se observa en el caso del PNU-120596 (Figura II.4B). En presencia de ACh $100 \mu\text{M}$ y PNU-120596 $1 \mu\text{M}$, las aperturas del receptor ($\alpha 7$)₅ se prolongaron significativamente y se agruparon en episodios de activación sostenidos de muy larga duración denominados *clusters* (~ 1 - 3 s), siendo indistinguibles de los generados por el receptor $\alpha 7$ de subunidades no concatenadas ($p > 0,05$ en cada caso, Figura II.4B, Tabla II.2). Tampoco se observaron diferencias en el ajuste de los histogramas de duraciones ni en el $\tau_{\text{crítico}}$ en presencia de los PAMs entre ambos receptores (Figura II.4B).

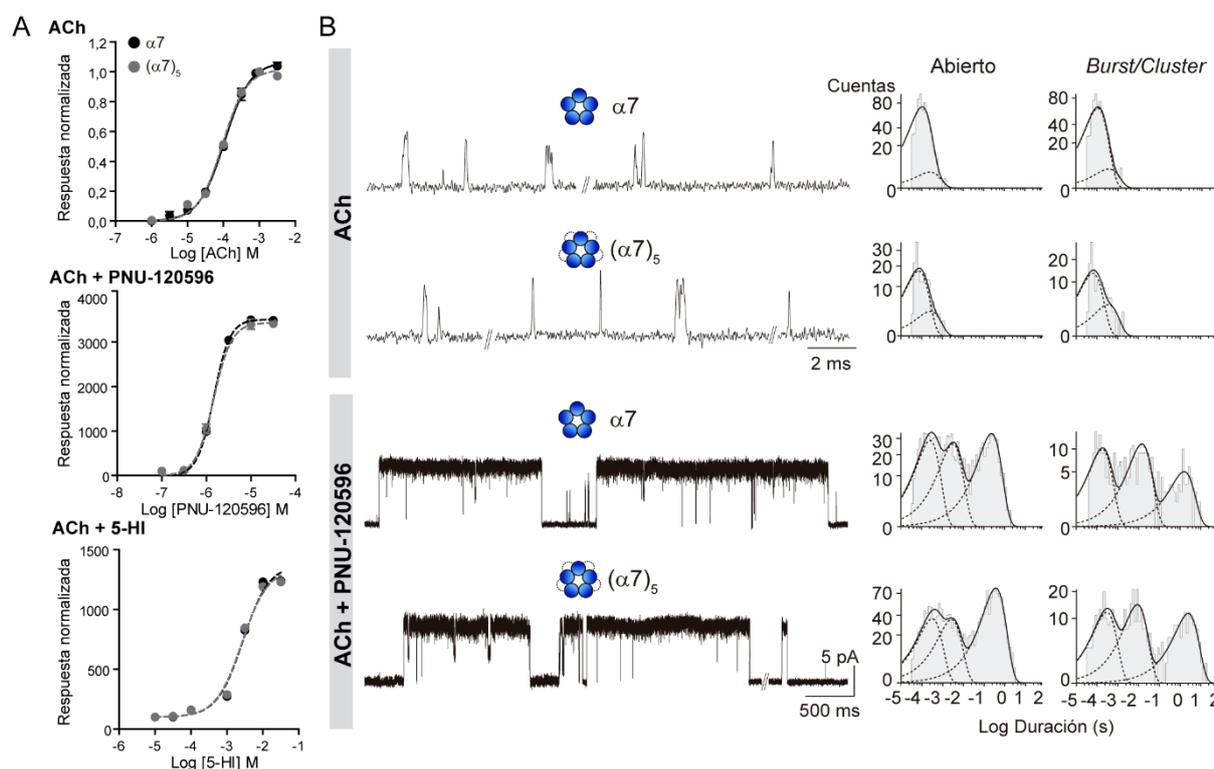


Figura II.4. Comparación de los perfiles de activación y modulación alostérica de los receptores $\alpha 7$ y $(\alpha 7)_5$. **A-** Curvas de concentración-respuesta para ambos receptores obtenidas a partir de las corrientes macroscópicas evocadas por la ACh a distintas concentraciones (arriba) o por ACh 30 μ M en presencia de PNU-120596 (centro) o 5-HI (abajo) a diferentes concentraciones. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM del pico de la corriente experimental normalizado al pico de la corriente de control. **B-** Perfiles de corrientes unitarias para ambos receptores en presencia de ACh 100 μ M (arriba) y ACh 100 μ M + PNU-120596 1 μ M (abajo). Filtro: 9 kHz y 3 kHz respectivamente. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts/clusters* para cada condición.

Estos hallazgos permiten concluir que el receptor concatamérico $(\alpha 7)_5$ presentó, en términos de activación ortostérica y modulación alostérica positiva por PAMs tipo I y II, un perfil farmacológico similar al del receptor $\alpha 7$ conformado por subunidades no concatenadas. Este control resulta de suma importancia, pues demuestra que la concatenación de las subunidades mediante *linkers* peptídicos no modifica las propiedades funcionales del receptor y, por lo tanto, valida el uso de los **receptores concataméricos como modelo de los receptores WT** constituidos por subunidades ensambladas no covalentemente, tal como se expresan fisiológicamente en un sistema nativo. Partiendo de esta premisa se construyeron los receptores concataméricos de $\alpha 7\beta 2$ con distintas estequiometrías para ser utilizados como modelos de los receptores $\alpha 7$ heteroméricos nativos.

1.1.2. Activación y modulación alostérica de los concatámeros $\alpha 7\beta 2$

1.1.2.1. Activación ortostérica por ACh

Hasta la actualidad sólo se han explorado las propiedades funcionales de los receptores $\alpha 7\beta 2$ a nivel de corrientes macroscópicas (Liu *et al.*, 2009, 2012; Murray *et al.*, 2012; Mowrey *et al.*, 2013;

Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Si bien algunos resultados fueron contradictorios, todos los estudios, tanto en sistemas de expresión nativos como heterólogos, reportaron para $\alpha 7\beta 2$ una menor velocidad de decaimiento y una menor amplitud del pico de corriente en comparación con el receptor $\alpha 7$ homomérico (Figura II.5A). Sin embargo, en ninguno de los casos se garantizó una única estequiometría del receptor $\alpha 7\beta 2$, siendo altamente probable que dichas corrientes macroscópicas procedieran de una población mixta de receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos. Con el objetivo de determinar la contribución real de la subunidad $\beta 2$ en las propiedades funcionales del canal pentamérico se construyeron concatámeros de receptores $\alpha 7\beta 2$ conteniendo una, dos y tres subunidades $\beta 2$, de modo tal que la estequiometría fuera estrictamente controlada (Figura II.3B-E). Dada la distinta longitud del extremo C-terminal entre las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$, y para mantener la longitud de los *linkers* peptídicos entre los concatámeros, se utilizaron nueve y ocho repeticiones AGS entre $\alpha 7$ - $\beta 2$ y entre $\beta 2$ - $\alpha 7$ respectivamente, en lugar de las diez repeticiones AGS empleadas para unir $\alpha 7$ - $\alpha 7$ (Figura II.3B-E). Todos los constructos lineales se iniciaron con una subunidad $\alpha 7$, dado que los ordenamientos que empezaban con la subunidad $\beta 2$ no resultaron funcionales o al menos no expresaron en niveles detectables por las técnicas electrofisiológicas.

Las curvas de concentración-respuesta, obtenidas por TEVC manual a un potencial de membrana de -60 mV en un rango de concentraciones de $0,1 \mu\text{M}$ - 1 mM de ACh para los tres concatámeros de $\alpha 7\beta 2$ expresados en ovocitos, mostraron un comportamiento muy similar entre sí y con respecto a las del receptor $\alpha 7$ concatenado y no concatenado. No hubo diferencias significativas en los valores de CE_{50} de la ACh entre ellos, siendo en todos los casos $\sim 100 \mu\text{M}$ ($p > 0,05$, Figura II.5B, Tabla II.1). Esta particularidad se encuentra en línea con los reportes previos sobre las corrientes macroscópicas de $\alpha 7\beta 2$ obtenidas en sistemas de expresión heterólogos (Murray *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015).

Receptor	ACh	PNU-120596		5-HI		n	N
	CE_{50} (μM)	CE_{50} (μM)	% Máx. potenciación	CE_{50} (mM)	% Máx. potenciación		
$\alpha 7$	108 ± 5	$1,5 \pm 0,2$	3513 ± 33	$2,8 \pm 0,6$	1376 ± 105	10	5
$(\alpha 7)_5$	93 ± 5	$1,5 \pm 0,4$	3492 ± 85	$2,6 \pm 0,3$	1346 ± 205	10	5
$(\alpha 7)_4\beta 2$	95 ± 4	$1,6 \pm 0,2$	3338 ± 76	$3,2 \pm 0,8$	1301 ± 114	8	5
$(\alpha 7)_3(\beta 2)_2$	97 ± 6	$1,4 \pm 0,3$	3300 ± 50	$2,4 \pm 0,6$	$114 \pm 6^{***}$	8	5
$(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$	104 ± 12	ND	ND	ND	ND	6	5

Tabla II.1. Activación y modulación alostérica positiva de los receptores $\alpha 7$ homoméricos y $\alpha 7\beta 2$ heteroméricos a nivel de corrientes macroscópicas. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM y fueron obtenidos a partir de las respectivas curvas de concentración-respuesta. La significancia estadística fue evaluada por ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples. ND: no determinado. El símbolo (*) indica diferencias significativas con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico no concatenado.

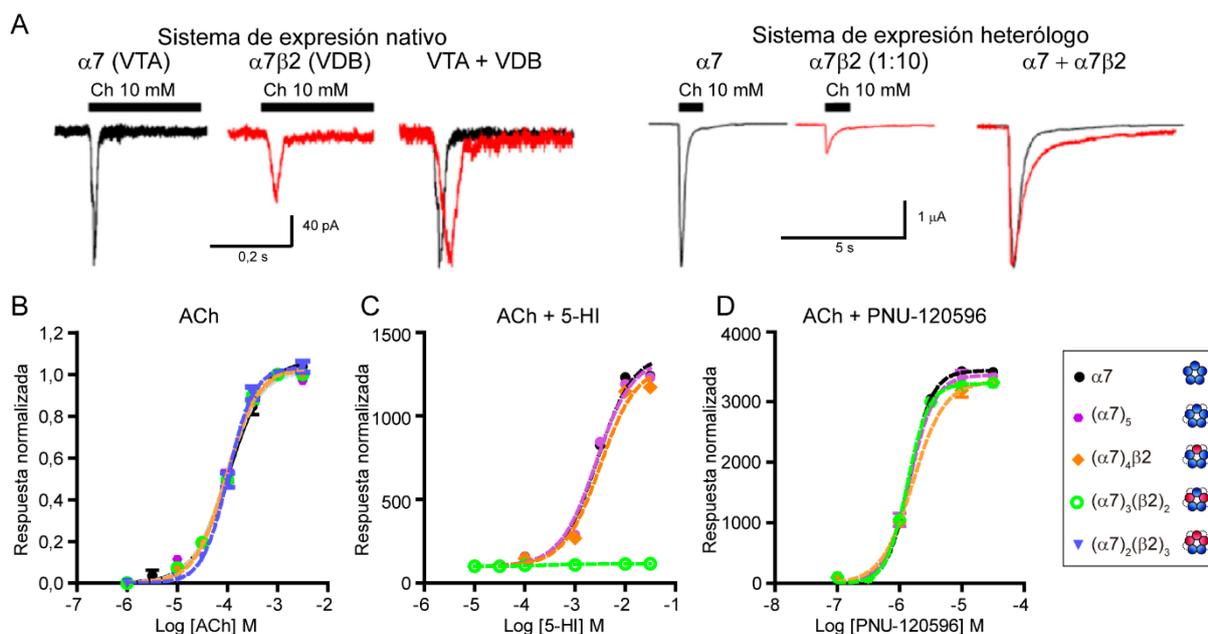


Figura II.5. Activación y modulación alostérica de receptores $\alpha 7\beta 2$ a nivel de corrientes macroscópicas.

A- Comparación de la cinética y amplitud de las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ y $\alpha 7\beta 2$ previamente reportada en la bibliografía (Modificado de (Wu *et al.*, 2016)). Se muestran corrientes representativas en sistemas de expresión nativos (izquierda, neuronas de rata de VTA (área tegmental ventral) y VDB (banda diagonal de Broca vertical)) y heterólogos (ovocitos de *Xenopus*).

B-D- Curvas de concentración-respuesta para los receptores $\alpha 7$, $(\alpha 7)_5$ y $\alpha 7\beta 2$ obtenidas a partir de las corrientes macroscópicas evocadas por ACh (**B**), ACh 30 μ M en presencia de 5-HI (**C**), y ACh 30 μ M en presencia de PNU-120596 (**D**) a diferentes concentraciones. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM del pico de la corriente experimental normalizado al pico de la corriente de control.

Para determinar el origen molecular de esas diferencias en la amplitud y en la velocidad de decaimiento observadas a nivel macroscópico, se procedió a evaluar la activación ortostérica de los receptores concataméricos $\alpha 7\beta 2$ en sus distintas estequiometrías a nivel de **corrientes unitarias** por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* y a -70 mV de potencial de membrana. Si bien los receptores concataméricos de $\alpha 7\beta 2$ activaron de forma similar al receptor $\alpha 7$ en un rango de ACh de 0,1 μ M-1,0 mM, se optó por utilizar una concentración de 1 mM para el registro de las corrientes unitarias (concentración superior a la CE_{50}), únicamente para garantizar un mayor número de eventos de activación ante la baja tasa de expresión de los concatámeros.

El **receptor concatamérico $(\alpha 7)_4\beta 2$** funcional fue obtenido por los constructos con una única subunidad $\beta 2$ en la posición dos o tres del ordenamiento lineal de subunidades, sin que se observen diferencias entre ambos (Figura II.3B-C). Con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico, la presencia de una subunidad $\beta 2$ en el pentámero no afectó la máxima amplitud (~ 10 pA), y a nivel cinético no modificó la duración de las aperturas individuales ($p > 0,05$), pero sí incrementó ligeramente la duración de los episodios de activación o *bursts* en $\sim 1,5$ veces ($p < 0,001$, Figura II.6A-B, Tabla II.2). El histograma de estado abierto se ajustó con dos componentes exponenciales, mientras que el histograma de *bursts* fue ajustado con tres componentes exponenciales, surgiendo un componente adicional más

prolongado, ausente en el receptor homomérico. El $\tau_{\text{crítico}}$ fue establecido en la intersección entre el primer y el segundo componentes del histograma de estado cerrado, al igual que para el receptor $\alpha 7$ (~200-400 μs) (Figura II.6A).

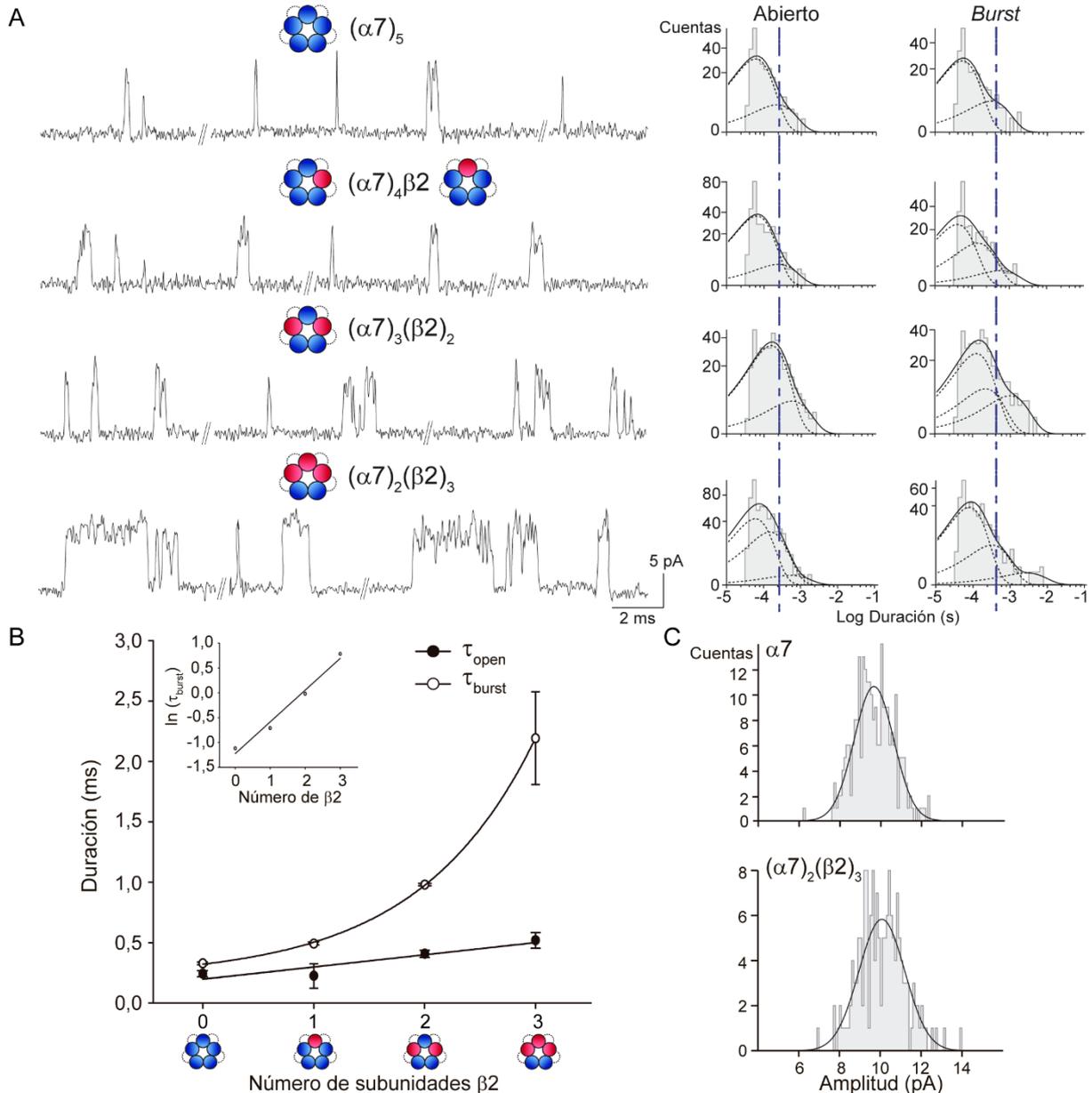


Figura II.6. Perfil de activación de los receptores concataméricos $\alpha 7\beta 2$ a nivel de corrientes unitarias. **A-** Registros representativos de corrientes microscópicas de los receptores concataméricos $(\alpha 7)_5$ y $\alpha 7\beta 2$ en sus distintas estequiometrías activados por ACh 1 mM. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. Las líneas punteadas verticales azules indican la duración media de las aperturas y de los *bursts* para el receptor homomérico, permitiendo distinguir cómo el incremento de las subunidades $\beta 2$ en el pentámero condujo a un aumento en las duraciones. **B-** Gráfico de las constantes de tiempo de estado abierto (círculos negros) y de *burst* (círculos blancos) en función del número de subunidades $\beta 2$ en el receptor. Las líneas sólidas representan las curvas ajustadas. Para las aperturas el ajuste fue por regresión lineal, y para los *bursts*, los parámetros de ajuste de la función exponencial fueron obtenidos por regresión lineal del gráfico inserto $\ln(\tau_{\text{burst}})$ vs número de subunidades $\beta 2$. **C-** Histogramas de amplitud para $\alpha 7$ y $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ construidos con eventos de duración superior a 0,3 ms.

El **receptor concatamérico $(\alpha 7)_3(\beta 2)_2$** con dos subunidades $\beta 2$ fue construido de forma análoga a la disposición de subunidades del receptor $\alpha 4\beta 2$ y de otros receptores heteroméricos donde la subunidad β se localiza de forma alternada entre dos subunidades α (Figura II.3D). La presencia de dos subunidades $\beta 2$ en el pentámero dio lugar a receptores funcionales sin afectar la máxima amplitud (~ 10 pA), pero provocando un incremento adicional en el tiempo de estado abierto y en la duración de los *bursts*, que resultaron ser $\sim 1,5$ veces ($p < 0,01$) y $\sim 3,0$ veces ($p < 0,001$) mayores a los del receptor $\alpha 7$ homomérico respectivamente (Figura II.6A-B, Tabla II.2). El histograma de estado abierto fue ajustado con dos componentes exponenciales, mientras que el histograma de *bursts* se ajustó con tres componentes exponenciales. El $\tau_{\text{crítico}}$ fue superior al del receptor homomérico, ya que surgió de la intersección entre el segundo y el tercer componentes del histograma de estado cerrado ($\sim 2-6$ ms) (Figura II.6A).

El arreglo pentamérico funcional del **receptor concatamérico $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$** presentó las tres subunidades $\beta 2$ consecutivas (Figura II.3E). Para este receptor, las duraciones de las aperturas y de los *bursts* se prolongaron aún más que en la estequiometría con dos subunidades $\beta 2$, siendo el incremento de aproximadamente $\sim 2,0$ veces ($p < 0,001$) y $\sim 7,0$ veces ($p < 0,05$) respectivamente, en comparación al receptor $\alpha 7$ homomérico (Figura II.6A-B, Tabla II.2). Los histogramas de aperturas y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales, y el $\tau_{\text{crítico}}$ fue establecido en la intersección entre el segundo y el tercer componentes del histograma de estado cerrado, al igual que para el receptor con dos subunidades $\beta 2$ ($\sim 2-6$ ms) (Figura II.6A). Por su parte, la amplitud máxima se mantuvo constante (~ 10 pA) como se observa en los registros de corrientes unitarias, al igual que en los concatámeros $\alpha 7\beta 2$ mencionados previamente. Al construir los histogramas de amplitud para eventos de duración superior a 0,3 ms, con el objetivo de permitir la completa resolución temporal, no se observaron diferencias significativas entre la amplitud de $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ ($9,70 \pm 0,21$ pA) y $\alpha 7$ ($9,65 \pm 0,41$ pA, $p > 0,05$, Figura II.6C).

En resumen, es posible decir que el incremento en el número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero de subunidades $\alpha 7$ no indujo cambios en la amplitud o conductancia unitaria del canal, pero sí en sus parámetros cinéticos, prolongando de forma lineal la duración de las aperturas (cada subunidad $\beta 2$ aportó $0,10 \pm 0,03$ ms) y de forma exponencial los episodios de activación sostenidos en *bursts*, que constituyen el parámetro cinético más sensible a la presencia de esta subunidad β .

Como un control adicional para verificar la presencia efectiva de la subunidad $\beta 2$ en el receptor pentamérico y su contribución en el **gatillado** o **gating** del canal iónico, se evaluó la **activación ortostérica** de los **concatámeros $\alpha 7\beta 2$** portando la mutación puntual **L9'T** o **L247T** en la **subunidad $\beta 2$** . Como se mencionó previamente, el residuo L9' forma parte del anillo hidrofóbico que constituye la compuerta de activación del canal (Introducción, págs. 14-15). La mutación puntual L9'T, que cambia

un residuo hidrofóbico por otro polar, incrementa notoriamente la probabilidad de apertura del receptor y disminuye considerablemente la velocidad de desensibilización (Revah *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 2012). Tanto es así que el perfil de corrientes unitarias del receptor $\alpha 7$ L9'T activado por la ACh, donde las cinco subunidades portan la mutación, se caracterizó por aperturas de ~ 10 ms que se agruparon en *bursts* de ~ 200 ms, los cuales ocasionalmente formaron episodios de activación muy sostenidos o *clusters* de ~ 1 s de duración, mostrando un comportamiento claramente diferente al del receptor $\alpha 7$ WT con sus breves y aisladas aperturas (Figura II.7).

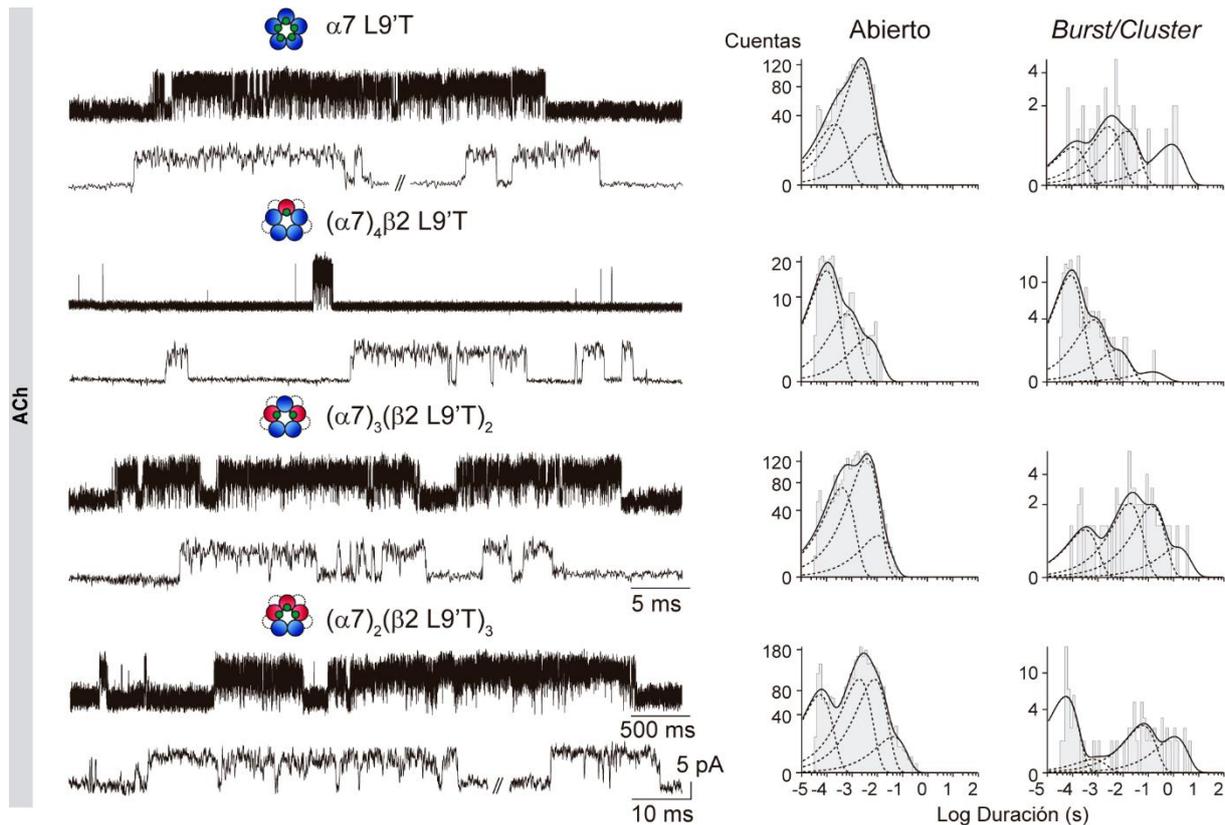


Figura II.7. Perfil de corrientes unitarias de los receptores concataméricos $\alpha 7\beta 2$ con subunidades mutantes $\beta 2$ L9'T. Registros representativos de corrientes microscópicas de los distintos receptores concataméricos portando la mutación L9'T en sus subunidades $\beta 2$, activados por ACh 1 mM. Por razones comparativas también se muestra el registro del receptor $\alpha 7$ L9'T. Los registros exhiben los *clusters* de mayor duración eventualmente detectados en cada caso, a dos escalas temporales. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts/clusters* para cada condición.

El patrón de activación ortostérica de los receptores concataméricos conteniendo subunidades $\alpha 7$ WT ensambladas con una, dos y tres subunidades $\beta 2$ L9'T resultó marcadamente diferente al de su respectivo control concatamérico salvaje (Figura II.7). En el receptor con una única subunidad $\beta 2$ mutante, el tiempo de estado abierto ($0,61 \pm 0,06$ ms, $n = 5$, $N = 3$) y la duración de los *bursts* ($3,31 \pm 1,22$ ms, $n = 5$, $N = 3$) se incrementaron con respecto al control. Incluso eventualmente se observaron aperturas aún más lentas ($\sim 3-4$ ms) capaces de formar *clusters* de $\sim 100-200$ ms (Figura II.7). Los receptores concataméricos con dos y tres subunidades $\beta 2$ L9'T exhibieron un comportamiento variable

similar, con aperturas y episodios de activación aún más prolongados. Los receptores con tres subunidades $\beta 2$ L9'T presentaron varios componentes de estado abierto ($0,72 \pm 0,04$ ms, $2,28 \pm 0,20$ ms y $8,28 \pm 2,00$ ms, $n = 4$, $N = 3$) y ocasionalmente *clusters* de larga duración (1459 ± 156 ms) conformados por aperturas con constantes de tiempo aún mayores (44 ± 7 ms) (Figura II.7). Por lo tanto, a partir de los cambios cinéticos detectados por la presencia de subunidades $\beta 2$ L9'T, es posible concluir que dicha subunidad efectivamente se incorporó en pentámeros funcionales, y que contribuyó al gatillado del canal y a la estabilidad del estado abierto o activado del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$.

1.1.2.2. Activación alostérica por 4BP-TQS

Dado que el agonista 4BP-TQS produce la activación alostérica del receptor $\alpha 7$ homomérico, se decidió evaluar su efecto en el receptor heteromérico $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ que contiene el máximo número de subunidades $\beta 2$. Como se describió en la parte I del capítulo I, la activación alostérica de $\alpha 7$ semeja la potenciación por el prototipo de PAM tipo II PNU-120596, ya que los agonistas alostéricos, también denominados ago-PAMs, pueden actuar como PAMs tipo II en presencia del agonista ortostérico. El receptor heteromérico $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ también fue activado de forma alostérica por 4BP-TQS $10 \mu\text{M}$, generando aperturas prolongadas (72 ± 38 ms, $n = 6$, $N = 3$) y episodios de activación en *clusters* de larga duración (1396 ± 539 ms, $n = 6$, $N = 3$) que no exhibieron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto a $\alpha 7$ activado alostéricamente ($\tau_{\text{open}} = 55 \pm 40$ ms, $n = 4$, $N = 3$, $\tau_{\text{cluster}} = 1834 \pm 970$ ms, $n = 4$, $N = 3$) (Figura II.8)

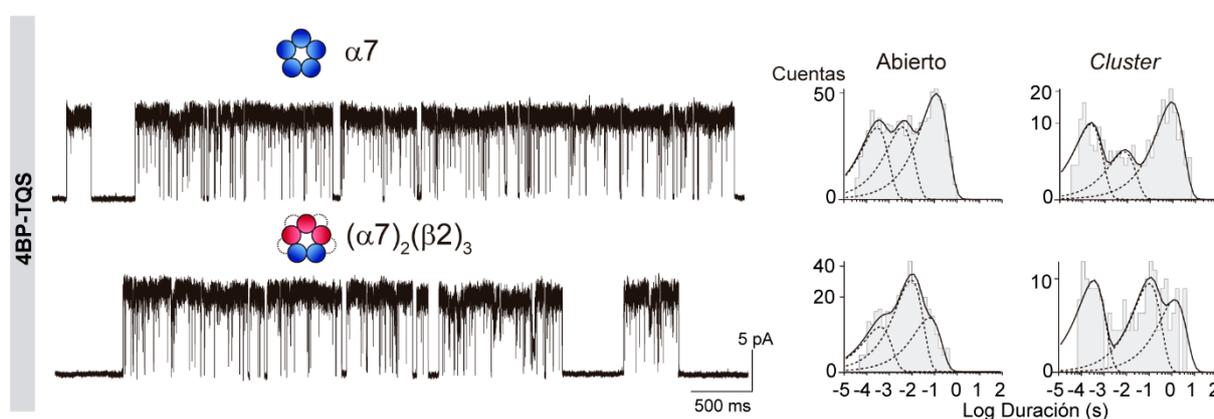


Figura II.8. Activación alostérica de los receptores $\alpha 7$ y $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$. Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ y $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ en presencia de 4BP-TQS $10 \mu\text{M}$. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *clusters* para cada condición.

1.1.2.3. Modulación alostérica positiva por PAMs tipo I y II

Como se ha descrito previamente, el enfoque terapéutico actual apunta al diseño y desarrollo de PAMs selectivos para el receptor $\alpha 7$ homomérico. Sin embargo, el reciente descubrimiento de los

receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ en el SNC plantea la posibilidad de que estos también constituyan un blanco farmacológico para los PAMs, cuestionando su selectividad. Con ese objetivo se analizaron los efectos de los prototipos de PAMs tipo I y II sobre las distintas estequiometrías de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Para ello se realizaron registros de corrientes unitarias por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* y a un potencial de membrana de -70 mV, en presencia de ACh 100-500 μ M y de los prototipos de PAMs en la concentración correspondiente a la CE_{50} de $\alpha 7$. También se registraron las corrientes macroscópicas en ovocitos por TEVC manual y a un potencial de membrana de -60 mV, para construir las curvas de concentración-respuesta utilizando ACh 30 μ M (CE_{20}) y concentraciones variables de los PAMs.

En la parte I del capítulo I se describió la modulación alostérica positiva ejercida por el prototipo de **PAM tipo I 5-HI** sobre el receptor $\alpha 7$ homomérico, potenciando las aperturas individuales e induciendo la activación en *bursts* (Tabla II.2). El 5-HI también prolongó las duraciones de las aperturas aisladas y de los *bursts* de los receptores $\alpha 7\beta 2$ heteroméricos con respecto a la condición en ausencia de modulador para cada receptor, excepto en el caso del *burst* de $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$, el cual no exhibió diferencias significativas con respecto a su control (Figura II.9A, Tabla II.2). Sin embargo, al comparar de forma absoluta las duraciones de las aperturas y de los *bursts* potenciados en los receptores heteroméricos con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico, se percibió una disminución de las constantes de tiempo a mayor número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero (Figura II.9A, gráfico de la izquierda). Dado que la presencia de las subunidades $\beta 2$ por sí misma ya había inducido cambios cinéticos en el canal, se calculó el efecto potenciador del 5-HI en cada receptor normalizando el valor de la constante de tiempo potenciada por la determinada en ausencia de PAM, con el objetivo de efectuar una comparación más apropiada (Figura II.9A, gráfico de la derecha). Así se observó que en el caso de los receptores concataméricos heteroméricos $\alpha 7\beta 2$, el grado de potenciación ejercido por el 5-HI decreció notoriamente en función del número de subunidades $\beta 2$ que conformaban el pentámero, siendo prácticamente incapaz de potenciar al receptor $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ (Figura II.9A, gráfico de la derecha). Para todos los receptores, los histogramas de estado abierto y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales, y el $\tau_{crítico}$ se obtuvo a partir de la intersección entre el segundo y el tercer componentes del histograma de estado cerrado ($\sim 2-6$ ms). En concordancia, en las curvas de concentración-respuesta para el 5-HI también se observó una reducción marcada del efecto potenciador, que a nivel macroscópico fue prácticamente nulo en los receptores con dos subunidades $\beta 2$ (Figura II.5C, Tabla II.1).

Para verificar si otros PAMs tipo I también evidenciaban ese comportamiento sobre los receptores $\alpha 7\beta 2$ se evaluó el accionar del **NS-1738** directamente sobre la estequiometría con tres subunidades $\beta 2$ (Figura II.9B). El modulador también potenció las duraciones de las aperturas y de los *bursts* con respecto a la condición control en ausencia de PAMs (Tabla II.2). Sin embargo, al comparar

de forma absoluta las constantes de tiempo potenciadas del receptor $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ con las del receptor $\alpha 7$, se observó una disminución en la duración de los episodios de activación (Figura II.9B, gráfico de la izquierda). Al igual que en el caso anterior, para efectuar una comparación más precisa se calculó el efecto potenciador del NS-1738, obtenido tras normalizar las constantes de tiempo en presencia de PAM con respecto a las determinadas en ausencia de modulador. Esto permitió detectar una notoria reducción en el grado de potenciación ejercido por el NS-1738 sobre el receptor $\alpha 7\beta 2$ heteromérico (Figura II.9B, gráfico de la derecha). Para ambos receptores, los histogramas de estado abierto y de *bursts* se ajustaron con tres componentes exponenciales, y el $\tau_{\text{crítico}}$ se obtuvo a partir de la intersección entre el tercer y el cuarto componentes del histograma de estado cerrado (~ 10 - 20 ms).

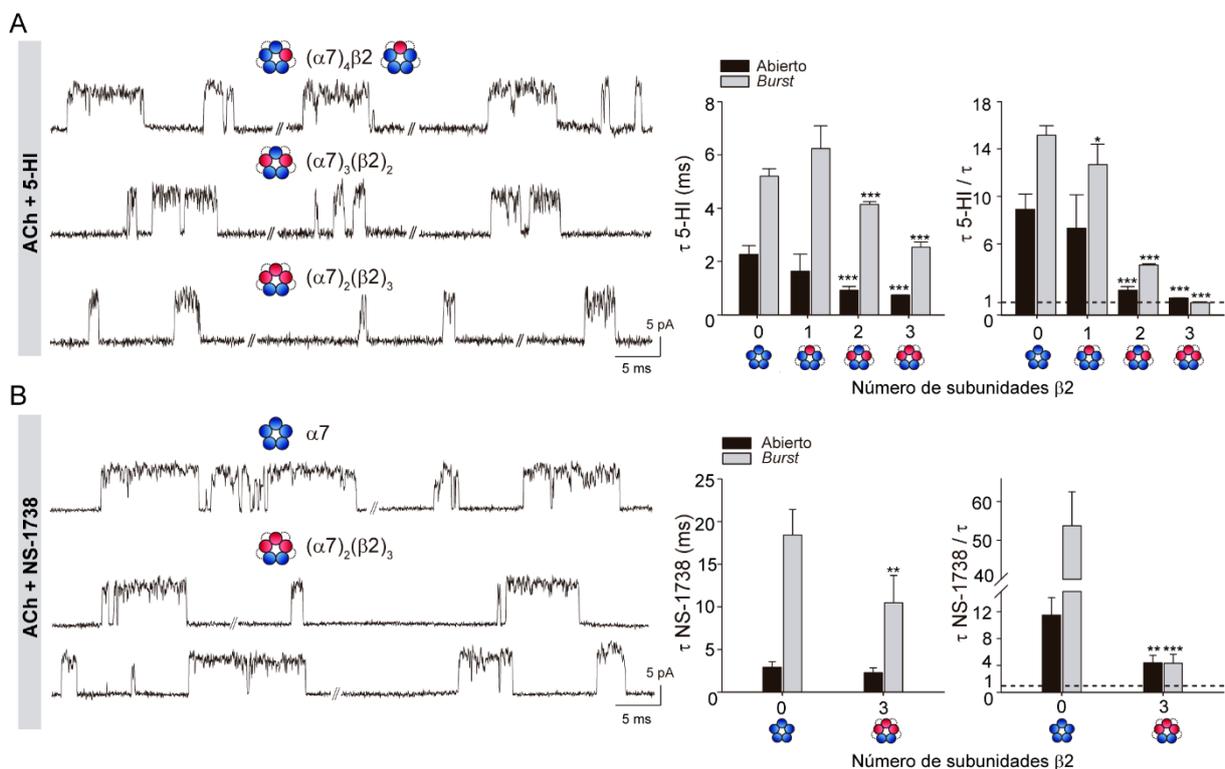


Figura II.9. Modulación alostérica positiva de los receptores concataméricos $\alpha 7\beta 2$ por PAMs tipo I. Registros representativos de corrientes unitarias de los receptores concataméricos $\alpha 7\beta 2$ en sus distintas estequiometrías en presencia de ACh 500 μM y 5-HI 2 mM (A) o ACh 500 μM y NS-1738 10 μM (B). Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan los gráficos de barras de las constantes de tiempo de las aperturas y de las *bursts* en forma absoluta (gráfico de la izquierda) o normalizadas al valor correspondiente en ausencia de PAMs para cada receptor (gráfico de la derecha). Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición correspondiente al receptor $\alpha 7$ homomérico.

Del mismo modo se evaluó el efecto del prototipo de **PAM tipo II PNU-120596** sobre los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ en sus distintas estequiometrías. La notoria prolongación de las aperturas y la aparición de *clusters* de muy larga duración característicos del receptor $\alpha 7$ en presencia de PNU-120596 también se observaron para los receptores $(\alpha 7)_4\beta 2$, $(\alpha 7)_3(\beta 2)_2$ y $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ (Figura

II.10A, Tabla II.2). Las constantes de tiempo de estado abierto y de *cluster* no exhibieron diferencias significativas entre los receptores $\alpha 7\beta 2$ heteroméricos y el homomérico $\alpha 7$ (Figura II.10B), demostrando que el aumento del número de subunidades $\beta 2$ no afectó la potenciación ejercida por el PAM tipo II. Los histogramas de estado abierto y de *clusters* se ajustaron con cuatro componentes, y el $\tau_{\text{crítico}}$ fue definido a partir de la intersección entre el tercer y cuarto componentes del histograma de estado cerrado (~ 60 - 100 ms). En concordancia, las curvas de concentración-respuesta para el PNU-120596 no mostraron diferencias significativas en la máxima potenciación ni en la CE_{50} entre los distintos receptores (Figura II.5D, Tabla II.1).

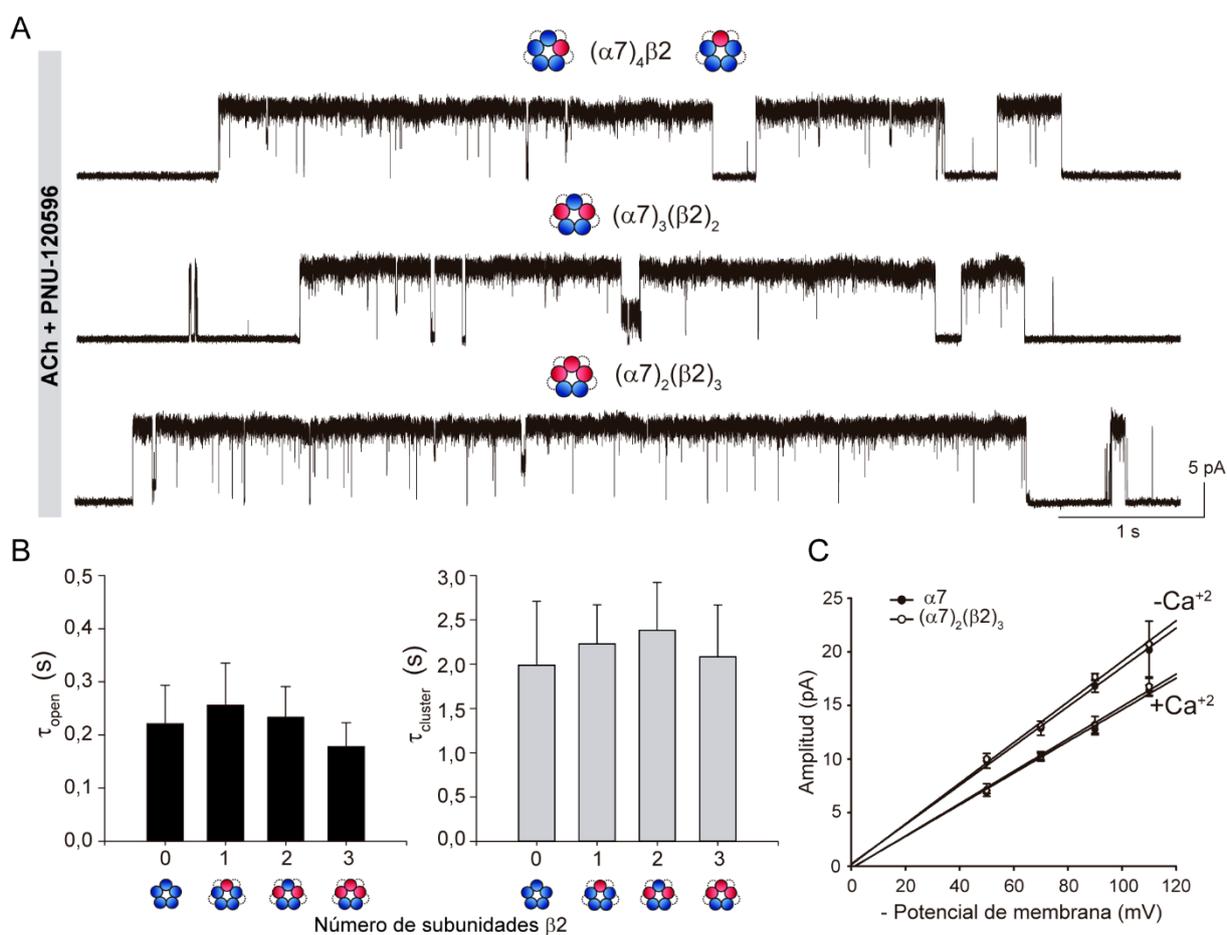


Figura II.10. Modulación alostérica positiva de los receptores concataméricos $\alpha 7\beta 2$ por PAMS tipo II. **A-** Registros representativos de corrientes unitarias de los receptores concataméricos $\alpha 7\beta 2$ en sus distintas estequiometrías en presencia de ACh $500 \mu\text{M}$ y PNU-120596 $1 \mu\text{M}$. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. **B-** Gráficos de barras de las constantes de tiempo de las aperturas y de los *clusters* en forma absoluta. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición del receptor $\alpha 7$ homomérico. **C-** Curvas I-V para los receptores $\alpha 7$ y $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ activados por ACh $100 \mu\text{M}$ y potenciados por PNU-120596 $1 \mu\text{M}$, en presencia o ausencia de iones Ca^{+2} .

En resumen, es posible decir que la modulación alostérica positiva de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ es diferencial para los PAMs tipo I y II. Mientras que los PAMs tipo II potenciaron por igual a los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos, los PAMs tipo I resultaron más selectivos

para el receptor $\alpha 7$ homomérico, pues su efecto potenciador disminuyó considerablemente en los receptores $\alpha 7\beta 2$.

Receptor	ACh	PAM	τ_{open} (ms)	τ_{burst} o $\tau_{cluster}$ (ms)	n	N
$\alpha 7$	100 μ M-1 mM	-	0,25 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01	4	4
	500 μ M	5-HI 2 mM	2,26 \pm 0,33***	5,20 \pm 0,28***	4	3
	500 μ M	NS-1738 10 μ M	2,91 \pm 0,66*	18,42 \pm 3,00***	4	3
	100 μ M	PNU-120596 1 μ M	221 \pm 72***	1988 \pm 718***	8	5
$(\alpha 7)_5$	100 μ M-1 mM	-	0,24 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02	3	3
	100 μ M	PNU-120596 1 μ M	205 \pm 44***	1867 \pm 937***	3	3
$(\alpha 7)_4\beta 2$	100 μ M-1 mM	-	0,22 \pm 0,10	0,49 \pm 0,02	3	3
	500 μ M	5-HI 2 mM	1,64 \pm 0,64**	6,24 \pm 0,86***	4	4
	100 μ M	PNU-120596 1 μ M	256 \pm 79**	2229 \pm 442***	5	3
$(\alpha 7)_3(\beta 2)_2$	100 μ M-1 mM	-	0,41 \pm 0,03	0,98 \pm 0,02	3	3
	500 μ M	5-HI 2 mM	0,93 \pm 0,14**	4,14 \pm 0,10***	4	4
	100 μ M	PNU-120596 1 μ M	234 \pm 57***	2382 \pm 540***	5	3
$(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$	100 μ M-1 mM	-	0,52 \pm 0,06	2,42 \pm 0,79	5	4
	500 μ M	5-HI 2 mM	0,74 \pm 0,01***	2,54 \pm 0,20	4	4
	500 μ M	NS-1738 10 μ M	2,28 \pm 0,57***	10,46 \pm 3,22***	5	3
	100 μ M	PNU-120596 1 μ M	178 \pm 45***	2081 \pm 587***	4	3

Tabla II.2. Activación y modulación alostérica positiva de los receptores $\alpha 7$ homoméricos y $\alpha 7\beta 2$ heteroméricos a nivel de corrientes unitarias. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *bursts/clusters* en presencia de agonista solo o combinado con los PAMs para los distintos receptores. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control en ausencia de PAM para cada receptor (*).

Además, considerando que el PAM tipo II potenció por igual las tres estequiometrías de $\alpha 7\beta 2$, los registros de corrientes microscópicas en presencia de PNU-120596 fueron utilizados para determinar la **amplitud** máxima completamente resuelta. Al igual que se observó en las corrientes unitarias activadas por la ACh, en todos los casos la máxima amplitud fue de ~ 10 pA, por lo tanto no hubo diferencias significativas entre los receptores heteroméricos y homomérico ($9,87 \pm 0,20$ pA, $10,21 \pm 0,72$ pA y $10,20 \pm 0,26$ pA para los receptores con una, dos y tres subunidades $\beta 2$ respectivamente, $p > 0,05$, $n = 4$, $N = 4$ en cada caso).

Para profundizar aún más en la influencia de las subunidades $\beta 2$ sobre la conductancia unitaria se realizaron curvas de amplitud versus voltaje (curvas I-V) en presencia y ausencia de iones Ca^{+2} en la solución de pipeta (Figura II.10C). No se detectaron diferencias significativas entre las conductancias unitarias del receptor homomérico $\alpha 7$ y del receptor heteromérico $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ en ambas condiciones, confirmando que las subunidades $\beta 2$ no afectaron este parámetro. Los valores promedio de conductancias unitarias, obtenidos a partir de las pendientes de las curvas I-V, fueron: $155,2 \pm 7,0$ pS para $\alpha 7$ y $159,8 \pm 4,4$ pS para $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ en la solución con iones Ca^{+2} 1,8 mM, y $175,2 \pm 5,8$ pS para $\alpha 7$ y $184,0 \pm 10,7$ pS para $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ en ausencia de iones Ca^{+2} (Figura II.10C) ($p > 0,05$, $n = 3$, $N = 3$ en cada caso).

1.2. *Electrical fingerprinting*

Como en sistemas nativos las subunidades se ensamblan fisiológicamente de forma no covalente, es preciso confirmar los resultados obtenidos con los concatámeros mediante el uso de subunidades aisladas. Para ello se aplicó una segunda estrategia experimental, la **técnica de *electrical fingerprinting*** (Figura II.2), basada en la introducción de mutaciones reporteras de la conductancia unitaria. Esta metodología fue desarrollada y empleada con éxito en diversos reportes previos (Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2011, 2013; DaCosta y Sine, 2013; DaCosta *et al.*, 2015).

Anteriormente se mencionó que en los receptores *Cys-loop* catiónicos, como los de 5-HT₃, se han identificado tres residuos en la hélice MA del ICD responsables de la conductancia unitaria, existiendo subunidades de baja conductancia o LC, donde los tres residuos consisten en argininas cargadas positivamente, y subunidades de alta conductancia o HC, donde los tres residuos se corresponden con aminoácidos polares o cargados negativamente (Introducción, págs. 16-17). Es así que las subunidades LC pueden formar canales funcionales, pero con una amplitud tan baja que no son detectados a nivel de canal único, a diferencia de los receptores constituidos por subunidades HC. La técnica de *electrical fingerprinting* se basa entonces en el **ensamblaje de subunidades HC y LC** con el objetivo de identificar las diversas **estequiometrías** de los receptores funcionales que se originen. La combinación variable de subunidades HC y LC da lugar a receptores con distintas conductancias unitarias, de modo tal que, a partir de las diferentes **poblaciones o clases de amplitud** de los eventos de activación detectados, es posible inferir las estequiometrías correspondientes a los receptores funcionales que los generan.

Particularmente en el caso del receptor $\alpha 7$, la subunidad $\alpha 7$ WT es HC, ya que presenta como determinantes tres residuos polares o cargados negativamente (Q428, E432 y S436), permitiéndole formar canales homoméricos de corrientes unitarias detectables y con una única población de amplitud máxima (~10 pA). Al mutar los tres residuos del ICD de $\alpha 7$ a argininas (Q428R, E432R, S436R), se obtiene una subunidad $\alpha 7$ LC, cuyos canales no pueden ser detectados a nivel de canal único (Figura II.11A, primer trazo). Sin embargo, al coexpresar subunidades $\alpha 7$ HC (WT) con $\alpha 7$ LC, se observan cinco poblaciones de amplitud claramente definidas de ~2 pA, 4 pA, 6 pA, 8 pA y 10 pA, que se corresponden con los arreglos o estequiometrías de receptores conteniendo una, dos, tres, cuatro y cinco subunidades HC, o de forma equivalente cuatro, tres, dos, una y cero subunidades LC en el pentámero respectivamente (Figura II.11A, segundo trazo). Por lo tanto, las **mutaciones en los determinantes de conductancia** de la subunidad $\alpha 7$ LC funcionan como **reporteras**, puesto que permiten inferir las estequiometrías de los receptores que originan los eventos de activación correspondientes a cada clase de amplitud (Andersen *et al.*, 2013; DaCosta y Sine, 2013; DaCosta *et al.*, 2015). Dado que en la técnica de *electrical fingerprinting* se requiere de una determinación precisa de la amplitud de las

corrientes unitarias, en el caso de $\alpha 7$, que presenta aperturas muy breves, los registros se realizan en presencia de agonista y un PAM, para incrementar las constantes de tiempo y favorecer la completa resolución de la amplitud (Andersen *et al.*, 2013).

En la presente parte del capítulo II se aplicó la técnica de *electrical fingerprinting* con dos fines, por un lado, para realizar un control de proteólisis de los concatámeros previamente caracterizados y, por otro lado, para evaluar las estequiometrías funcionales y la interfaz de activación de los receptores $\alpha 7\beta 2$ originados a partir del coensamblaje de subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ no concatenadas. Los registros de corrientes unitarias fueron llevados a cabo en células BOSC23 por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached*, a un potencial de membrana de -70 mV y en presencia de ACh $100 \mu\text{M}$ y PNU-120596 $1 \mu\text{M}$. Se seleccionó este PAM tipo II para favorecer la completa resolución de la amplitud porque anteriormente se demostró que potenció por igual a las distintas estequiometrías de los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 7\beta 2$.

1.2.1. Control de proteólisis

La composición y longitud de los *linkers* peptídicos en los concatámeros resultan fundamentales para garantizar la eficiente expresión de los receptores con estequiometría controlada, no sólo al asegurar la orientación espacial de las subunidades, sino también al impedir o disminuir la probabilidad de que ocurra proteólisis o degradación del concatámero (Metodología, págs. 42-43). Si bien la utilización de concatámeros con subunidades $\beta 2$ L9'T permitió verificar la presencia de esta subunidad en el canal funcional y presumiblemente la ausencia de proteólisis, esta última no puede ser descartada en su totalidad por medio de estos controles. Aún podrían coexistir receptores concataméricos y receptores $\alpha 7$ homoméricos generados por subunidades $\alpha 7$ liberadas por degradación de algunos concatámeros.

Por estas razones, con el objetivo de certificar la ausencia de proteólisis de forma más precisa, se coexpresó el concatámero $(\alpha 7)_5$, que presenta el máximo número de repeticiones AGS en el *linker* peptídico, con la subunidad $\alpha 7$ LC en proporción 1 : 1, aplicándose la técnica de *electrical fingerprinting*. Si ocurriera proteólisis, las subunidades $\alpha 7$ WT individuales desprendidas del concatámero como producto de su degradación serían capaces de coensamblarse con las subunidades $\alpha 7$ LC, generando canales pentaméricos con distintas estequiometrías y diversas clases de amplitud, tal como se describió previamente (Andersen *et al.*, 2013; DaCosta y Sine, 2013; DaCosta *et al.*, 2015). En este caso sólo se detectó una única población de amplitud de ~ 10 pA correspondiente al receptor concatamérico $(\alpha 7)_5$ ($n = 4$, $N = 3$), demostrando que el mismo permaneció intacto (Figura II.11A, tercer trazo). De este modo se comprobó que los *linkers* peptídicos de los concatámeros, compuestos por repeticiones AGS, no fueron blanco de proteasas intracelulares en el sistema de expresión utilizado, verificando así la **ausencia de proteólisis**.

1.2.2. Receptores $\alpha 7\beta 2$ a partir de subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ no concatenadas

Como se mencionó anteriormente, hasta el presente sólo se han publicado reportes de corrientes macroscópicas en sistemas heterólogos coexpresando subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ en una proporción que favoreciera las estequiometrías heteroméricas (1 : 8 o 1 : 10 respectivamente) (Murray *et al.*, 2012; Mowrey *et al.*, 2013; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Sin embargo, las subunidades $\alpha 7$ tienden a coensamblarse entre sí formando receptores homoméricos, favorecidos incluso por la presencia de chaperonas específicas como Ric-3 y NACHO, cuya influencia en los niveles de expresión de los receptores $\alpha 7$ heteroméricos se desconoce. Por lo tanto, los registros de corrientes macroscópicas reportados proceden de una combinación de receptores homoméricos y heteroméricos de diversas estequiometrías no identificables, derivando en conclusiones controversiales e inexactas. Por estas razones, se aplicó la técnica de *electrical fingerprinting* coexpresando subunidades $\alpha 7$ LC y subunidades $\beta 2$ WT, con la finalidad de eliminar la detección de las corrientes unitarias correspondientes al receptor $\alpha 7$ homomérico, midiendo únicamente aquellas generadas por los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$. De este modo se determinaron las estequiometrías de los receptores heteroméricos funcionales y las interfaces que intervienen en su activación ortostérica.

1.2.2.1. Estequiometrías de los receptores $\alpha 7\beta 2$ funcionales

Mediante el uso de concatámeros se identificaron receptores $\alpha 7\beta 2$ funcionales con una, dos y tres subunidades $\beta 2$, cuyos ordenamientos fueron diseñados en base a las estequiometrías descriptas para $\alpha 4\beta 2$ y los reportes previos que sugerían interfaces de activación $\alpha 7/\alpha 7$ (Murray *et al.*, 2012). Por lo tanto, más allá de su funcionalidad, las subunidades fueron forzadas a un dado arreglo espacial que puede o no reflejar el ensamblaje fisiológico no covalente real de las subunidades en la célula. Por esta razón, es necesaria la confirmación de las estequiometrías de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ funcionales a través del coensamblaje de subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$ no concatenadas. Al analizar los residuos determinantes de la conductancia para la subunidad $\beta 2$ se observa la misma presenta aminoácidos polares o cargados negativamente en lugar de argininas (Figura II.11B), de forma similar a la subunidad $\alpha 7$ WT, por lo cual se infirió que se trataba de una subunidad HC, plausible de ser combinada con la subunidad $\alpha 7$ LC para aplicar la técnica de *electrical fingerprinting*.

Al expresar únicamente la subunidad $\alpha 7$ LC en presencia de ACh 100 μ M y PNU-120596 1 μ M, se formaron receptores homoméricos cuya conductancia unitaria no puede ser detectada, obteniéndose registros de canal único con aparente ausencia de actividad (Figura II.11A, primer trazo). Sin embargo, al coexpresar las subunidades $\alpha 7$ LC y $\beta 2$ en proporción 1 : 8 o 1 : 10 respectivamente, para favorecer las formas heteroméricas del receptor sobre la homomérica, se detectó actividad a nivel de canal único, indicando que efectivamente ambas subunidades se ensamblaron en receptores

funcionales y confirmando la alta conductancia de la subunidad $\beta 2$ (Figura II.11A, cuarto trazo). Al comparar la coexpresión de $\alpha 7$ LC y $\beta 2$ con respecto a la condición $\alpha 7$ LC + $\alpha 7$ previamente descrita se pudieron observar dos claras diferencias. Por un lado, la frecuencia de los parches o sellos activos fue considerablemente menor, sugiriendo que la expresión funcional de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ fue más dificultosa que la de los receptores $\alpha 7$ homoméricos en las condiciones evaluadas. Por otro lado, se detectaron únicamente tres clases de amplitud de ~ 2 pA, ~ 4 pA y ~ 6 pA en lugar de las cinco poblaciones de amplitud anteriormente mencionadas (Figura II.11A, cuarto trazo).

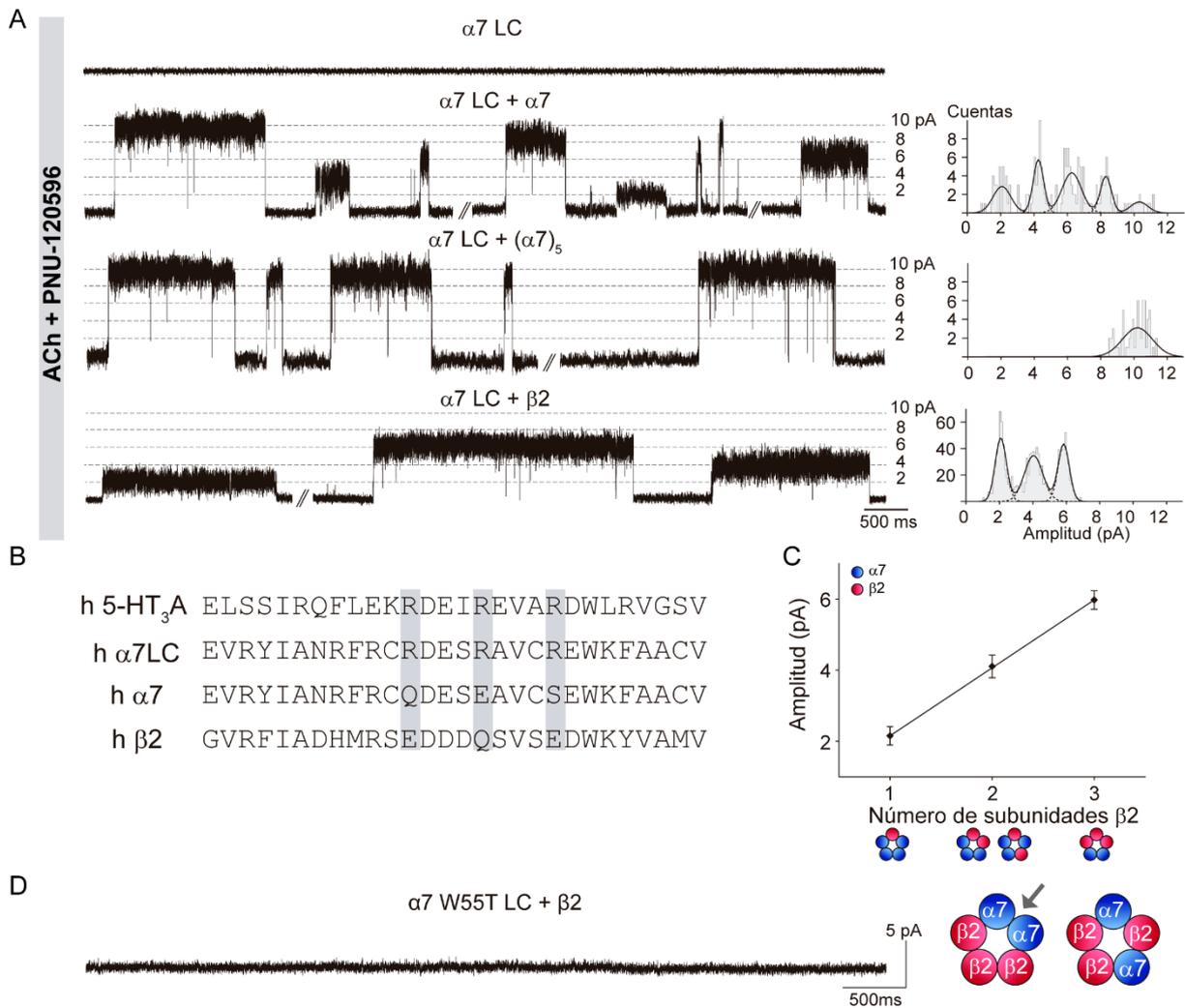


Figura II.11. Estrategia de *electrical fingerprinting*. **A-** Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ LC, $\alpha 7$ LC + $\alpha 7$, $\alpha 7$ LC + $(\alpha 7)_5$ y $\alpha 7$ LC + $\beta 2$ en presencia de ACh 100 μ M y PNU-120596 1 μ M. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se muestran histogramas de amplitud representativos para cada condición. **B-** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos a nivel del ICD de las subunidades 5-HT₃A, $\alpha 7$ LC, $\alpha 7$ y $\beta 2$ humanas, resaltando en gris los determinantes de la conductancia unitaria. **C-** Gráfico de la amplitud promedio de la corriente unitaria versus el número de subunidades $\beta 2$. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. **D-** Registros representativos a nivel de canal único de $\alpha 7$ W55T LC + $\beta 2$ en presencia de ACh 100 μ M y PNU-120596 1 μ M, evidenciando la ausencia de actividad. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se muestra un diagrama esquemático de los posibles arreglos del receptor $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ donde se observan las interfaces de activación $\alpha 7/\alpha 7$ o $\alpha 7/\beta 2$. La flecha gris señala la única interfaz efectiva de activación por la ACh.

Previamente, al evaluar los receptores $\alpha 7\beta 2$ concataméricos, se concluyó que la presencia de subunidades $\beta 2$ no afectó la amplitud de los canales en ninguna de las estequiometrías, dado que no se encontraron diferencias significativas respecto de la amplitud del receptor $\alpha 7$ homomérico. Además, la subunidad $\beta 2$ posee determinantes de conductancia en la región del ICD similares a los de la subunidad $\alpha 7$, lo que permitió concluir que dichos residuos también gobiernan la conductancia unitaria de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$, tal como ocurre en el caso del receptor $\alpha 7$ homomérico. Al graficar la amplitud de los canales en función del número de subunidades $\beta 2$, se observó un comportamiento lineal que fue ajustado por mínimos cuadrados, obteniéndose un valor de pendiente de $1,91 \pm 0,02$ pA por subunidad $\beta 2$ (Figura II.11C). Esto significa que la presencia de cada subunidad $\beta 2$ en el pentámero contribuye con ~ 2 pA de la amplitud total del receptor. En consecuencia, las **clases de amplitud de ~ 2 pA, ~ 4 pA y ~ 6 pA** se correspondieron con receptores funcionales de **una, dos y tres subunidades $\beta 2$** respectivamente. Las duraciones de las aperturas y de los *clusters* en presencia de PNU-120596 no exhibieron diferencias significativas entre las distintas clases de amplitud ni con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico, tal como se observó previamente para los receptores concataméricos ($p > 0,05$ en cada caso, Tabla II.3). No se detectaron poblaciones de amplitud de ~ 8 pA ni ~ 10 pA, que se corresponderían con receptores de cuatro y cinco subunidades $\beta 2$ respectivamente. Estos hallazgos se encuentran en línea con las estequiometrías de los receptores $\alpha 7\beta 2$ funcionales con hasta tres subunidades $\beta 2$ inferidas a partir de los concatámeros, validando su caracterización. Cabe aclarar que por la técnica de *electrical fingerprinting* empleada no es posible garantizar el orden o disposición de ese número de subunidades en el pentámero, pudiendo o no coincidir con los ordenamientos evaluados en los concatámeros diseñados. Por esta razón, esta estrategia se aplicó nuevamente combinando subunidades con mutaciones en la interfaz de activación.

Clases de amplitud (pA)	Nº de subunidades $\beta 2$	τ_{open} (ms)	$\tau_{cluster}$ (ms)	n	N
$2,15 \pm 0,26$	1	108 ± 27	1451 ± 1322	4	3
$4,10 \pm 0,32$	2	142 ± 55	1907 ± 752	4	3
$5,97 \pm 0,26$	3	179 ± 55	2897 ± 743	5	3

Tabla II.3. Parámetros cinéticos de los canales correspondientes a las distintas clases de amplitud observadas al coexpresar las subunidades $\alpha 7$ LC y $\beta 2$. Se muestran los valores de duración media de las aperturas y de los *clusters* en presencia de ACh $100 \mu\text{M}$ + PNU-120596 $1 \mu\text{M}$ para las distintas poblaciones de amplitud. Los datos se presentan como el promedio \pm SD. La significancia estadística para los parámetros cinéticos fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición del receptor homomérico potenciado por PNU-120596 (*).

1.2.2.2. Interfaz de activación ortostérica

En los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ existen dos posibles interfaces de activación ortostérica: la interfaz $\alpha 7/\alpha 7$, como las del receptor homomérico; o la interfaz $\alpha 7/\beta 2$, donde $\beta 2$ aporta la cara complementaria al sitio de unión del agonista. Para determinar si efectivamente la subunidad $\beta 2$ contribuye al sitio de unión ortostérico se aplicó la técnica de *electrical fingerprinting* coexpresando

subunidades $\beta 2$ y $\alpha 7$ W55T LC en células BOSC23, y se realizaron registros de corrientes unitarias en presencia de ACh 100 μM y PNU-120596 1 μM . Esta mutación puntual en el W55 del *loop D* de la cara complementaria de la subunidad $\alpha 7$ la torna no funcional, ya que es uno de los residuos esenciales para la activación por ACh (Introducción, pág. 14). De este modo se inhabilitan las interfaces $\alpha 7/\alpha 7$, siendo posible la activación ortostérica de los receptores únicamente a través de las interfaces $\alpha 7/\beta 2$. Sin embargo, no se detectó actividad de canales iónicos en $n = 19$ registros ($N = 3$) (Figura II.11D), indicando que la **activación ortostérica** por ACh de los receptores $\alpha 7\beta 2$ ocurre primordialmente por la **interfaz $\alpha 7/\alpha 7$** , mientras que la interfaz $\alpha 7/\beta 2$ no mediaría la activación eficaz.

2. RECEPTORES HETEROMÉRICOS $\alpha 7\beta 4$

Si bien aún no se han identificado receptores $\alpha 7$ heteroméricos distintos de $\alpha 7\beta 2$ en sistemas nativos, ciertas evidencias experimentales sugieren que la subunidad $\alpha 7$ es capaz de coensamblarse con otras subunidades, como por ejemplo $\beta 4$ (Criado *et al.*, 2012). Por ello se diseñaron **receptores concataméricos** o **concatámeros $\alpha 7\beta 4$** , con el objetivo de evaluar el impacto diferencial de las distintas subunidades β en la activación ortostérica del pentámero de $\alpha 7$. Los mismos fueron construidos con una, dos y tres subunidades $\beta 4$ de forma análoga a las estequiometrías funcionales de $\alpha 7\beta 2$ (Figura II.12B-D). Estos receptores también presentan las cinco subunidades proteicas covalentemente unidas desde el extremo C-terminal de una subunidad hasta el extremo N-terminal de la subunidad adyacente mediante *linkers* peptídicos de AGS. Dada la distinta longitud del extremo C-terminal entre las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 4$ se utilizaron ocho repeticiones AGS para unir $\alpha 7\text{-}\beta 4$ y $\beta 4\text{-}\alpha 7$, en lugar de las diez y seis repeticiones AGS empleadas para enlazar $\alpha 7\text{-}\alpha 7$ y $\beta 4\text{-}\beta 4$ respectivamente (Figura II.12A-D).

El ADNc de los concatámeros fue cotransfectado en células BOSC23 con el ADNc de la chaperona Ric-3 en relación 1 : 4 respectivamente. Se realizaron registros de corrientes unitarias por la técnica de *patch-clamp* en configuración *cell-attached* y a -70 mV de potencial de membrana, en presencia de ACh 500 μM .

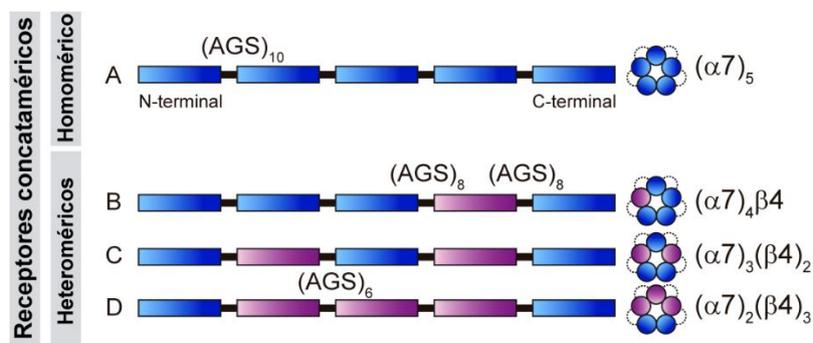


Figura II.12. Diagrama esquemático de los constructos concatenados pentaméricos de $\alpha 7\beta 4$. Las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 4$ se muestran en color azul y violeta respectivamente. A la izquierda se observan los constructos lineales y a la derecha los concatámeros ensamblados junto con la denominación correspondiente. Los *linkers* peptídicos de AGS se muestran como líneas negras sólidas o punteadas.

El **receptor concatamérico $(\alpha 7)_4\beta 4$** con una única subunidad $\beta 4$ resultó funcional (Figura II.12B), exhibiendo notorias diferencias a nivel de amplitud y cinética de las corrientes unitarias con el receptor $\alpha 7$ homomérico (Figura II.13). Por un lado, la amplitud se incrementó significativamente ($14,69 \pm 0,83$ pA, $p < 0,001$, $n = 3$, $N = 3$) con respecto a la máxima amplitud del receptor $\alpha 7$ ($9,99 \pm 0,41$ pA, $n = 4$, $N = 4$), tal como se observó en los registros de canal único y en el histograma de amplitud construido con eventos de duración superior a 0,3 ms (Figura II.13B). Por otro lado, la duración de las aperturas aisladas no se modificó ($\tau_{open} = 0,27 \pm 0,03$ ms), aunque las mismas se agruparon en episodios de activación o *bursts* muy prolongados ($\tau_{burst} = 9,20 \pm 1,76$ ms), de aproximadamente ~ 26 veces la duración de los breves e infrecuentes *bursts* del receptor $\alpha 7$ homomérico (Figura II.13A). El histograma de estado abierto se ajustó con un único componente exponencial, mientras que el histograma de *bursts* fue ajustado con tres componentes exponenciales. El $\tau_{crítico}$ fue establecido en la intersección entre el segundo y tercer componentes del histograma de estado cerrado, siendo de $\sim 3-5$ ms (Figura II.13A).

El **receptor concatamérico $(\alpha 7)_3(\beta 4)_2$** que presenta dos subunidades $\beta 4$ alternadas también resultó funcional (Figura II.12C). Tal como se observa en los registros de corrientes unitarias (Figura II.13A), la amplitud aumentó significativamente ($17,75 \pm 0,25$ pA, $p < 0,001$, $n = 3$, $N = 3$) con respecto a la del receptor $\alpha 7$ homomérico. Las duraciones de las aperturas individuales y de los episodios de activación en *bursts* se incrementaron de forma notoria en $\sim 2,5$ veces y ~ 25 veces respectivamente en comparación con el receptor $\alpha 7$ ($\tau_{open} = 0,70 \pm 0,06$ ms y $\tau_{burst} = 8,73 \pm 0,43$ ms, Figura II.13A). Los histogramas de estado abierto y de *bursts* se ajustaron con dos y tres componentes exponenciales respectivamente. El $\tau_{crítico}$ fue establecido en la intersección entre el segundo y tercer componentes del histograma de estado cerrado, siendo de $\sim 3-5$ ms (Figura II.13A). Aunque las aperturas más prolongadas de $(\alpha 7)_3(\beta 4)_2$ posibilitaron la resolución completa de la amplitud máxima sin necesidad de restringir la duración de los eventos, los histogramas de amplitud se construyeron igualmente con eventos de duración superior a 0,3 ms, con el objetivo de efectuar las comparaciones bajo las mismas condiciones que para el receptor $\alpha 7$ homomérico (Figura II.13B).

Por último, el **receptor concatamérico $(\alpha 7)_2(\beta 4)_3$** con tres subunidades $\beta 4$ consecutivas, análogo al ordenamiento lineal del receptor $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$, no resultó funcional (Figura II.11D), ya que no se detectó actividad de canales iónicos en un total de $n = 25$ registros ($N = 8$, Figura II.13A). Cabe aclarar que la ausencia de actividad de este concatámero sólo hace referencia a este ordenamiento de subunidades en particular, por lo tanto, no se descarta completamente la funcionalidad de la estequiometría de $\alpha 7\beta 4$ con tres subunidades $\beta 4$. Otros constructos lineales de $(\alpha 7)_2(\beta 4)_3$ con idéntico o distinto arreglo espacial de las subunidades podrían resultar funcionales.

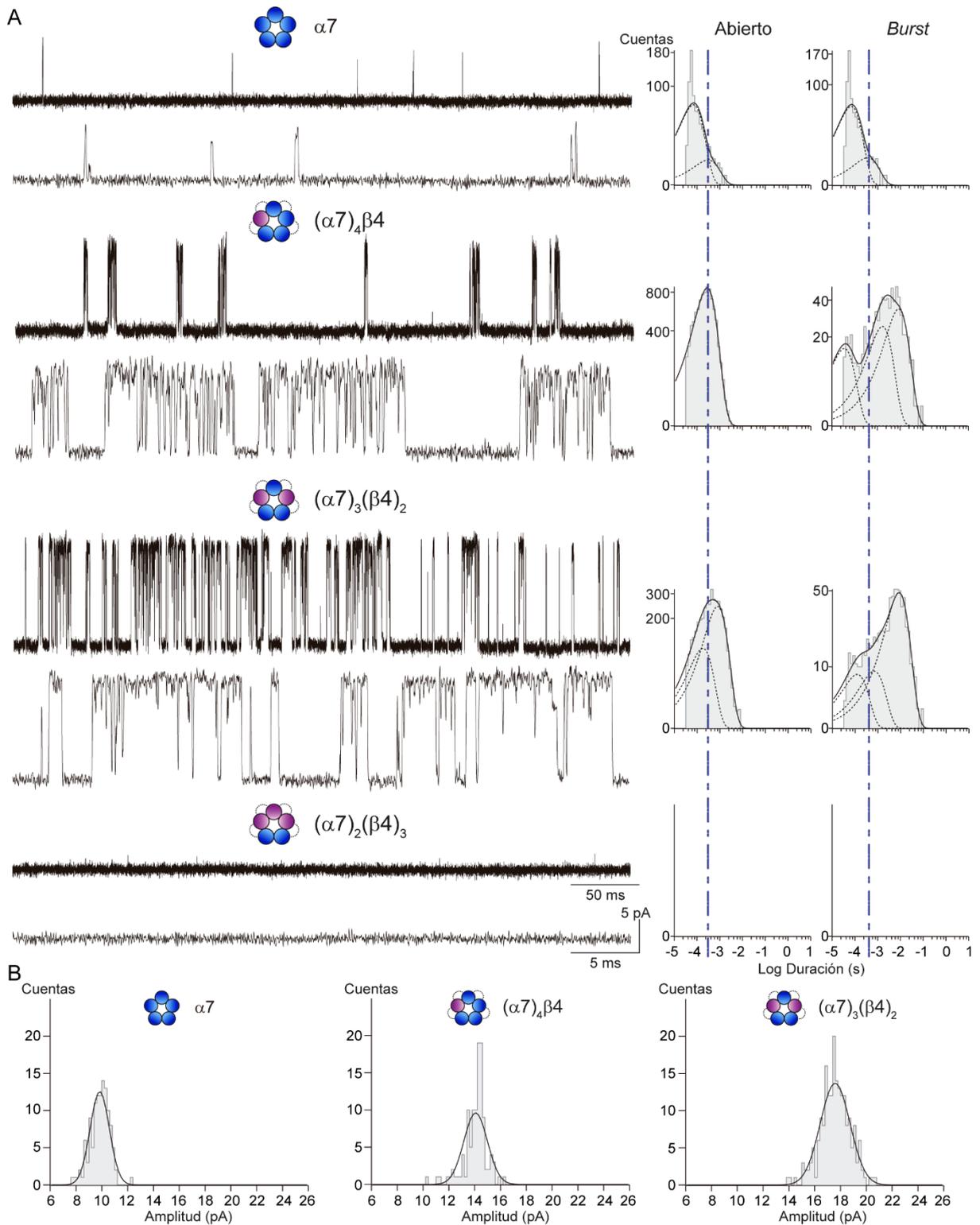


Figura II.13. Perfil de activación de los receptores concataméricos $\alpha 7\beta 4$ a nivel de corrientes unitarias. **A-** Registros representativos de corrientes microscópicas de $\alpha 7$ y $\alpha 7\beta 4$ en sus distintas estequiometrías activados por ACh 500 μ M. El receptor $(\alpha 7)_2(\beta 4)_3$ diseñado no resultó funcional. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se observan histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. Las líneas punteadas verticales azules indican la duración media de las aperturas y de los *bursts* para el receptor homomérico, permitiendo distinguir cómo el incremento de las subunidades $\beta 4$ en el pentámero condujo a un aumento en las duraciones. **B-** Histogramas de amplitud para $\alpha 7$, $(\alpha 7)_4\beta 4$ y $(\alpha 7)_3(\beta 4)_2$ construidos con eventos de duración superior a 0,3 ms.

Al comparar los concatámeros $\alpha 7\beta 4$ entre sí se observó que la amplitud y la duración de las aperturas individuales del canal iónico aumentaron de forma significativa ($p < 0,01$) al pasar de una a dos subunidades $\beta 4$ en el arreglo pentamérico, mientras que la duración de los *bursts* permaneció sin cambios ($p > 0,05$). Por lo tanto, el incremento en el número de subunidades $\beta 4$ en el pentámero de subunidades $\alpha 7$ provocó un aumento en la **amplitud** o conductancia unitaria del canal iónico (~ 4 pA por cada subunidad $\beta 4$) y un notorio cambio en los **parámetros cinéticos**, prolongando la duración de las aperturas, pero principalmente induciendo en gran proporción la formación de episodios de activación sostenidos denominados *bursts*. Es posible inferir que el impacto ejercido por la presencia de la subunidad $\beta 4$ en el pentámero de $\alpha 7$ fue aún más profundo que el generado por la subunidad $\beta 2$, ya que esta última sólo modificó la cinética del canal iónico de una forma más moderada, sin afectar significativamente la conductancia unitaria.

Discusión

Contrariamente a la clásica teoría acerca del ensamblaje de subunidades en los nAChRs, la subunidad $\alpha 7$ resultó ser capaz de generar receptores no sólo homoméricos, sino también heteroméricos. El hallazgo de los **receptores $\alpha 7\beta 2$** neuronales condujo a numerosos interrogantes acerca de su localización, rol fisiológico, influencia en condiciones patológicas, estequiometrías y perfil farmacológico distintivo con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico, emergiendo así un novedoso campo de investigación.

Los receptores $\alpha 7\beta 2$ se localizan en áreas discretas del cerebro murino y humano asociadas a **cognición, aprendizaje y memoria** (Liu *et al.*, 2009, 2012; Mowrey *et al.*, 2013; Moretti *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). La mayor proporción de estos receptores fue detectada en el **cerebro anterior basal**, uno de los principales sistemas colinérgicos del encéfalo, que emite sus proyecciones extensamente hacia diversas zonas, incluidas la **corteza** y el **hipocampo**, incidiendo así en la modulación de diversos circuitos y funciones cerebrales (Introducción, págs. 7-8). A nivel del hipocampo los resultados fueron inconsistentes, pues fue detectado allí en cerebros de ratas y ratones jóvenes (Liu *et al.*, 2012), pero no en adultos (Moretti *et al.*, 2014); mientras que en humanos no ha sido explorada esta estructura cerebral. Estas controversias pueden deberse a diferencias genuinas en la expresión del receptor entre las distintas especies y/o estadios del desarrollo, o bien, a la diferente sensibilidad de los ensayos empleados para determinar su presencia, ya que los receptores $\alpha 7\beta 2$ constituyen sólo una fracción menor del total de receptores $\alpha 7$. Si bien el receptor $\alpha 7$ homomérico también se expresa en células no neuronales y exhibe un rol dual ionotrópico/metabotrópico, el receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ ha sido reportado únicamente en neuronas con actividad ionotrópica hasta el presente, tanto a nivel presináptico como postsináptico. Además, se ha descrito en organelas intracelulares como las mitocondrias, donde al igual que otros nAChRs, desempeñaría un rol regulando la formación del poro mitocondrial y la apoptosis (Gergalova *et al.*, 2012, 2014).

La **significancia fisiológica** de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$, dada su localización, parece estar vinculada a la modulación de la señalización colinérgica en procesos fisiológicos cognitivos y, por ende, en condiciones patológicas asociadas, como la enfermedad de Alzheimer. Con respecto a esta última se reportó una mayor sensibilidad del receptor $\alpha 7\beta 2$ al bloqueo por concentraciones o niveles patológicamente relevantes del péptido β -amiloide oligomérico (~ 1 nM), en contraste con el receptor homomérico que requiere de concentraciones más elevadas para ser inhibido (~ 100 nM) (Liu *et al.*, 2009, 2012). Por esta razón, se presume una especial influencia del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ en la patogénesis de dicho desorden neurodegenerativo, habiéndose planteado al menos dos posibles mecanismos: la inhibición de $\alpha 7\beta 2$ por el β -amiloide provocaría deficiencias en la señalización colinérgica del sistema del cerebro anterior basal y del hipocampo, afectando la cognición y la memoria

de forma directa; o la inhibición crónica de $\alpha 7\beta 2$ induciría de forma compensatoria una sobreexpresión de $\alpha 7$ en las neuronas, provocando hiperexcitabilidad, neurotoxicidad y muerte de las mismas (Liu *et al.*, 2013; Liu, Xie, *et al.*, 2015). Además, se demostró una mayor sensibilidad del receptor $\alpha 7\beta 2$ a anestésicos volátiles como el isoflurano, con un posible sitio de unión en la interfaz ECD-TMD de la subunidad $\beta 2$, por lo tanto también tendría incidencia en procesos terapéuticos como la anestesia (Mowrey *et al.*, 2013).

Para poder determinar fehacientemente la **funcionalidad diferencial** del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico, es preciso conocer las estequiometrías funcionales y las diferencias en sus mecanismos moleculares de acción. Los estudios funcionales disponibles hasta el presente a nivel de corrientes macroscópicas presentaron ciertas inconsistencias, debido a que se utilizó una población mixta de receptores homoméricos y heteroméricos con sus diversas estequiometrías (Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016). Además, no se han identificado ligandos específicos para el receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ que permitan activarlo selectivamente. Por estas razones, en el capítulo II de la presente tesis se abordaron los mecanismos moleculares de **activación y modulación alostérica de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$** bajo un estricto control de su estequiometría funcional, con la finalidad de dilucidar su rol diferencial con respecto a su contraparte homomérica, y la contribución real de las subunidades $\beta 2$ en los arreglos pentaméricos de subunidades $\alpha 7$.

Se identificaron tres **estequiometrías funcionales** del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ conteniendo una, dos y tres subunidades $\beta 2$, a través de dos estrategias: el uso de concatámeros con subunidades covalentemente unidas, y la técnica de *electrical fingerprinting* con subunidades no concatenadas. Por un lado, la **tecnología de concatámeros** garantiza no sólo la estequiometría en términos de composición de subunidades, sino también del ordenamiento o arreglo espacial de las mismas (Ericksen y Boileau, 2007; Carbone *et al.*, 2009; Mazzaferro *et al.*, 2011, 2017; Bouzat *et al.*, 2018). En los resultados aquí expuestos se validó el uso de esta técnica mediante la realización de tres controles que permitieron verificar distintas premisas. En primer lugar, la concatenación o unión covalente de las subunidades no afectó las propiedades farmacológicas ni funcionales del receptor, como se demostró al comparar $(\alpha 7)_5$ con $\alpha 7$. En segundo lugar, la subunidad $\beta 2$ de interés fue efectivamente incorporada en los receptores funcionales, como se observó con la introducción de la mutación L9'T. En último lugar, el *linker* peptídico de repeticiones AGS no fue blanco de proteasas intracelulares, garantizando así la ausencia de proteólisis, como se comprobó al coexpresar $(\alpha 7)_5$ con $\alpha 7$ LC. Por otro lado, el uso de subunidades no concatenadas en la **técnica de *electrical fingerprinting*** permite evaluar simultáneamente las distintas estequiometrías en términos de composición de subunidades que se ensamblan no covalentemente, es decir, de una forma no forzada y más próxima a la que ocurre

fisiológicamente, aunque por sí sola no permite determinar el ordenamiento o arreglo espacial de las subunidades (Rayes *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2011, 2013; DaCosta *et al.*, 2015; Bouzat *et al.*, 2018).

Respecto de las estequiometrías evaluadas, con una subunidad β_2 sólo existe un único ordenamiento espacial posible que resultó funcional en ambas estrategias, y con tres subunidades β_2 existen dos arreglos posibles, uno análogo al del receptor $\alpha_4\beta_2$ de alta sensibilidad donde sólo dos subunidades β_2 son consecutivas, y otro con las tres subunidades β_2 de forma consecutiva. Únicamente este último resultó funcional por ambas estrategias, ya que el receptor conserva al menos una interfaz α_7/α_7 para mediar la activación efectiva. En cambio, para la estequiometría de dos subunidades β_2 , en los receptores concataméricos se evaluó el ordenamiento con subunidades alternadas simulando al receptor $\alpha_4\beta_2$, el cual resultó funcional. Este resultado no descarta la existencia de un arreglo pentamérico funcional con las dos subunidades β_2 consecutivas que, si bien no fue diseñado como concatámero, sí puede haberse formado al coexpresar las subunidades no concatenadas por la técnica de *electrical fingerprinting*. De todas formas, dado que ambos ordenamientos simplemente diferirían en el número de interfaces α_7/α_7 , es probable que no existan diferencias funcionales muy notorias entre ambos arreglos, ya que se demostró que la subunidad β_2 no incide significativamente en la interfaz de activación. Aunque ambas estrategias, el uso de concatámeros y la técnica de *electrical fingerprinting*, presentan sus ventajas y limitaciones, resultaron individualmente valiosas y complementarias entre sí, validando las estequiometrías de los receptores heteroméricos $\alpha_7\beta_2$ funcionales y posibilitando un abordaje completo de su activación y modulación alostérica a nivel molecular.

Considerando a nivel macroscópico la **activación ortostérica** de los receptores heteroméricos $\alpha_7\beta_2$ por la ACh, se observó que la misma actúa como agonista completo y con similar potencia para todas las estequiometrías al igual que para el receptor homomérico α_7 ($CE_{50} \sim 100 \mu\text{M}$). Si bien los estudios previos presentan ciertas inconsistencias por las poblaciones mixtas de receptores, la mayoría coinciden con los resultados aquí expuestos (Murray *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015), mientras que sólo un reporte evidenció una ligera disminución en la potencia del agonista endógeno sobre el receptor heteromérico (Zwart *et al.*, 2014). Este hallazgo puede resultar atípico si se compara con otros nAChRs heteroméricos, pero no lo es tanto al considerar el mecanismo de activación particular del receptor α_7 homomérico y las interfaces de activación de $\alpha_7\beta_2$. Por un lado, el receptor α_7 puede activar en su máxima respuesta a través de la ocupación por agonista de una única interfaz α_7/α_7 (Andersen *et al.*, 2013). Por otro lado, aquí se demostró que las tres estequiometrías posibles de los receptores $\alpha_7\beta_2$ también activaron a través de interfaces α_7/α_7 , siendo una sola interfaz suficiente para mediar la activación efectiva, como se observó en el caso de $(\alpha_7)_2(\beta_2)_3$. Es así que $\alpha_7\beta_2$ exhibió un perfil de activación más semejante al del receptor α_7 y

claramente distinto al de los receptores heteroméricos donde $\beta 2$ actúa de subunidad complementaria. Comparando con otros agonistas, además de ACh sólo la epibatidina fue reportada como agonista completo de $\alpha 7\beta 2$, mientras que los restantes agonistas completos no selectivos y selectivos del receptor $\alpha 7$ resultaron agonistas parciales con una potencia similar o ligeramente menor (Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016). Por su parte, los agonistas parciales del receptor $\alpha 7$ presentaron CE_{50} similares o mayores con aún menor eficacia sobre el receptor heteromérico, por lo cual se propuso su comportamiento como antagonistas funcionales de este último, tornándolos una potencial herramienta farmacológica para distinguir entre ambos subtipos de receptores (Zwart *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016). Es evidente que la presencia de la subunidad $\beta 2$ en el pentámero afecta principalmente la eficacia, con menores o nulos cambios en la potencia de los agonistas no endógenos. Si bien no se han realizado estudios sobre el número de interfaces $\alpha 7/\alpha 7$ requeridas para la activación del receptor homomérico por otros agonistas distintos de la ACh, si los mismos necesitaran de más de una interfaz, podría explicarse esta disminución de la eficacia observada en el receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ donde es menor la disponibilidad de interfaces $\alpha 7/\alpha 7$. Incluso esa menor cantidad de interfaces $\alpha 7/\alpha 7$ en el receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ puede ser responsable de la menor potencia de la mayoría de los agonistas, ya que a menor número de sitios de unión disponibles, disminuye la sensibilidad al agonista (Raves *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2013). Otra posible explicación sería que las interfaces $\alpha 7/\alpha 7$ en el receptor heteromérico no sean funcionalmente equivalentes, dependiendo de las subunidades que las rodean y de la presencia de agonista en interfaces $\alpha 7/\beta 2$, las cuales podrían funcionar como sitios de unión no ortodoxos y modular la activación desde las otras interfaces funcionales, incidiendo de alguna manera en la eficacia y en la sensibilidad al agonista (Mazzaferro *et al.*, 2011). Se requerirán futuros estudios para comprender en profundidad las bases moleculares de estas diferencias en la eficacia y potencia de los distintos agonistas para ambos subtipos de receptores.

Como se mencionó anteriormente, en el presente capítulo de tesis se comprobó que la **interfaz $\alpha 7/\alpha 7$** media la **activación ortostérica** eficaz del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ por el agonista endógeno, ya que al inhabilitarse la cara complementaria de $\alpha 7$ con la mutación W55T, la ACh fue incapaz de activar los canales. Más aún, la ausencia de una población de ~ 8 pA al coexpresar $\alpha 7$ LC con $\beta 2$ por la técnica de *electrical fingerprinting* demostró que un receptor de cuatro subunidades $\beta 2$, con sólo interfaces $\alpha 7/\beta 2$ y carente de interfaces $\alpha 7/\alpha 7$, resulta inviable y no funcional. Este hallazgo se encuentra en línea con lo propuesto por un reporte previo utilizando otras mutaciones en el sitio de unión de la ACh (Murray *et al.*, 2012), y con el hecho de que los antagonistas selectivos del receptor homomérico $\alpha 7$, como α -Bgt y MLA, también bloquean completamente las respuestas del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$, por ende su activación no podría estar ocurriendo por interfaces $\alpha 7/\beta 2$ (Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014). Respecto del antagonista dihidro- β -eritroidina (DH β E), más selectivo

para β_2 , los resultados fueron controversiales, detectándose desde una mayor potencia sobre el receptor heteromérico $\alpha_7\beta_2$ hasta ninguna diferencia con respecto a α_7 (Liu *et al.*, 2009, 2012; Murray *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que agonistas selectivos de β_2 , capaces de activar receptores heteroméricos desde interfaces con β como cara complementaria, no presentan actividad intrínseca sobre el receptor heteromérico $\alpha_7\beta_2$, confirmando que la activación debe ocurrir primordialmente por interfaces α_7/α_7 (Zwart *et al.*, 2014). Pese a estas evidencias, no es posible descartar un rol de α_7/β_2 como sitio de unión no ortodoxo, capaz de unir el agonista sin mediar activación eficaz, pero ocasionando cambios conformacionales que modulen la activación y las propiedades funcionales del receptor, tal como se ha demostrado para la interfaz α_4/α_4 de $\alpha_4\beta_2$ (Mazzaferro *et al.*, 2011, 2014; Benallegue *et al.*, 2013). En ese caso, tampoco se descarta que en un futuro se descubran o desarrollen ligandos capaces de activar selectivamente al receptor heteromérico a través de la interfaz α_7/β_2 .

Los estudios previos sobre las corrientes macroscópicas de los receptores heteroméricos $\alpha_7\beta_2$ también coinciden en reportar una menor amplitud y una disminución de la velocidad de decaimiento o desensibilización en comparación con el receptor homomérico α_7 (Liu *et al.*, 2009, 2012; Murray *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Para descifrar el origen molecular de esos cambios se evaluó la **activación ortostérica** de los receptores heteroméricos $\alpha_7\beta_2$ por la ACh a nivel de las **corrientes unitarias o microscópicas**.

Respecto de la **cinética**, se observó que al aumentar el número de subunidades β_2 en el pentámero, las duraciones de las aperturas y de los episodios de activación en *bursts* se incrementaron progresivamente. El tiempo de estado abierto aumentó linealmente, mientras que la duración de los *bursts* resultó el parámetro cinético más sensible, con un incremento exponencial notorio. La presencia de *bursts* prolongados, siendo de hasta ~ 7 veces mayor duración que en α_7 , constituyeron la marca cinética particular y distintiva de los receptores heteroméricos $\alpha_7\beta_2$. Por lo tanto, la presencia de subunidades β_2 en el pentámero disminuye la velocidad de desensibilización de los receptores heteroméricos con respecto al homomérico, permitiendo que el canal permanezca más tiempo en el estado abierto y favoreciendo su rápida y sucesiva reapertura dando lugar a *bursts*, los cuales finalizan al desensibilizar el receptor. Estos hallazgos a nivel molecular se correlacionan con la menor velocidad de decaimiento observada en las corrientes macroscópicas con poblaciones mixtas de receptores (Moretti *et al.*, 2014; Zwart *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015). Además, se verificó que las subunidades β_2 contribuyeron al gatillado del canal iónico, a través de la introducción mutaciones puntuales L9'T, modificando marcadamente sus propiedades cinéticas. En consecuencia, se concluye que la principal contribución de la incorporación de subunidades β_2 en los receptores α_7 heteroméricos es a nivel cinético, prolongando la activación y reduciendo la velocidad de desensibilización, en contraste a la

cinética rápida del receptor $\alpha 7$ homomérico. Estas propiedades funcionales diferenciales deben estar asociadas a su rol fisiológico y fisiopatológico distintivo, impactando significativamente en la señalización intracelular por Ca^{+2} y en la excitabilidad neuronal.

Respecto de la **amplitud**, las corrientes unitarias de los receptores $\alpha 7$ homomérico y heteroméricos no mostraron diferencias significativas entre sí, siendo la máxima amplitud de ~ 10 pA. Incluso esto fue confirmado en presencia de PNU-120596, ya que previamente se demostró en el capítulo I que los PAMs no modifican la amplitud, sino que facilitan su completa resolución al prolongar las aperturas. En estas condiciones también se determinó la conductancia unitaria del receptor $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$ mediante curvas I-V en presencia y ausencia de Ca^{+2} , obteniéndose valores similares a los del receptor $\alpha 7$ homomérico. Este hallazgo resulta sorprendente en comparación a otros nAChRs heteroméricos como $\alpha 4\beta 2$, donde las distintas estequiometrías exhiben diferentes amplitudes y conductancias unitarias. Sin embargo, los determinantes de conductancia de dichos receptores no se conocen en su totalidad, mientras que para la subunidad $\alpha 7$ está claramente definido que los tres residuos polares o cargados negativamente del ICD son responsables su alta conductancia (Andersen *et al.*, 2013; DaCosta y Sine, 2013; Hassaine *et al.*, 2014). Al estar ensambladas las cinco subunidades HC en el pentámero, a nivel de los portales intracelulares se forma un anillo polar o con carga negativa que define la conductancia unitaria del canal. Casualmente, la subunidad $\beta 2$ también es de alta conductancia por poseer esos tres residuos del ICD polares o con carga negativa, lo que le permite contribuir al igual que $\alpha 7$ en el anillo intracelular determinante de la conductancia unitaria, con ~ 2 pA por subunidad. Esto explica por qué las subunidades $\beta 2$ presentes en el pentámero, independientemente del número, no afectaron la amplitud ni la conductancia unitaria de los receptores heteroméricos, sino que sólo modificaron las propiedades cinéticas de los mismos. Entonces, la menor amplitud de las corrientes macroscópicas de $\alpha 7\beta 2$ no se vincula a cambios en la amplitud de los canales iónicos, sino que puede deberse a una menor probabilidad de apertura y/o a un menor número de receptores expresados en la membrana celular. Esto último se asocia a la baja expresión de los receptores $\alpha 7\beta 2$ detectada por la menor proporción de parches activos en la técnica de *electrical fingerprinting*, probablemente por la necesidad de chaperonas u otros requerimientos especiales que favorezcan el ensamblaje de $\alpha 7$ con $\beta 2$, hasta el momento desconocidos.

Por lo tanto, considerando los dos **subtipos de nAChRs mayoritarios** en el SNC, el **receptor homomérico $\alpha 7$** y el **receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$** , los resultados aquí expuestos demostraron que el **receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$** exhibió un **comportamiento funcional único y distintivo**, conservando algunas particularidades propias de las subunidades $\alpha 7$ con la influencia de las subunidades $\beta 2$, sin experimentar un cambio completo o radical hacia el perfil de receptor $\beta 2$ heteromérico. Respecto de la **estequiometría**, $\alpha 4\beta 2$ presenta dos formas posibles, con dos y tres subunidades $\beta 2$ (Nelson *et al.*,

2003; Moroni *et al.*, 2008), mientras que $\alpha 7\beta 2$ evidenció tres formas posibles en los sistemas heterólogos evaluados, con una, dos y tres subunidades $\beta 2$. El ordenamiento de las subunidades en $\alpha 4\beta 2$ con subunidades $\beta 2$ alternadas garantiza la presencia de **interfaces de activación** $\alpha 4/\beta 2$, mientras que interfaces como la $\alpha 4/\alpha 4$ actúan como sitios de unión no ortodoxos (Mazzaferro *et al.*, 2011, 2014; Benallegue *et al.*, 2013). Esto implica que $\beta 2$ aporta necesariamente la cara complementaria del sitio de unión de agonista. En contraste, los ordenamientos de $\alpha 7\beta 2$ fueron funcionales siempre que hubiera alguna interfaz $\alpha 7/\alpha 7$ para que la ACh medie la activación, ya que la misma no fue posible a través de las interfaces $\alpha 7/\beta 2$. Esto significa que ambas caras del sitio ortostérico deben ser aportadas por subunidades $\alpha 7$. El diferente número de subunidades $\beta 2$ en $\alpha 4\beta 2$ determina que ambas estequiometrías exhiban distinta **sensibilidad a la ACh**, mientras que en $\alpha 7\beta 2$ todas las estequiometrías evidenciaron CE_{50} similares, pues una única interfaz $\alpha 7/\alpha 7$ resultó suficiente para mediar la activación completa. En relación a la **cinética** de las corrientes unitarias, la estequiometría de $\alpha 4\beta 2$ con tres subunidades $\beta 2$ exhibe componentes de apertura de mayor duración (~ 10 ms) que la de dos subunidades $\beta 2$ ($\sim 3-4$ ms) (Mazzaferro *et al.*, 2017). El mismo comportamiento se observó en los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$, donde al aumentar progresivamente el número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero, se incrementó la duración de las aperturas y de los episodios de activación en *bursts*. A su vez, las distintas estequiometrías de $\alpha 4\beta 2$ presentan diferente **conductancia unitaria**, con amplitudes de canal único de ~ 4 pA y ~ 3 pA para los receptores con dos y tres subunidades $\beta 2$ respectivamente (Mazzaferro *et al.*, 2017), mientras que las tres estequiometrías de $\alpha 7\beta 2$ mostraron la misma amplitud máxima de ~ 10 pA, coincidente con la del receptor homomérico $\alpha 7$. Estas diferencias podrían explicarse por los distintos **determinantes de conductancia** en ambos subtipos de receptores. Para $\alpha 4\beta 2$ no están totalmente esclarecidos, pero se ha propuesto que la distinta amplitud entre ambas estequiometrías podría deberse a las cargas opuestas de los residuos que conforman el anillo extracelular bordeando el segmento M2, donde la subunidad $\alpha 4$ contiene un residuo de glutamato y la subunidad $\beta 2$ un residuo de lisina (Hansen *et al.*, 2008; Mazzaferro *et al.*, 2011). Por el contrario, en el pentámero de subunidades $\alpha 7$, los residuos del anillo del ICD resultan los principales determinantes de la conductancia, y al incorporarse subunidades $\beta 2$ HC, se mantienen los residuos polares o cargados negativamente en los portales intracelulares, de modo tal que la amplitud de las corrientes unitarias no se ve afectada. Respecto de la **permeabilidad al Ca^{+2}** , a mayor número de subunidades $\beta 2$ disminuye la corriente fraccional de dichos iones divalentes en $\alpha 4\beta 2$, justamente por la introducción de cargas positivas de lisinas en el anillo extracelular negativo de glutamatos de $\alpha 4$. En los resultados aquí expuestos se demostró que no hubo diferencias en la conductancia unitaria en ausencia y en presencia de Ca^{+2} entre los receptores $\alpha 7\beta 2$ y el receptor $\alpha 7$, sin embargo, esto no descarta cambios en la permeabilidad a dicho ion, ya que la misma no fue evaluada. De hecho, la subunidad $\alpha 7$, al igual que $\alpha 4$, presenta residuos de glutamato en el anillo extracelular del segmento

M2, y la incorporación de subunidades $\beta 2$ en el pentámero también invertiría las cargas tal como ocurre en $\alpha 4\beta 2$. Aun así, dada la alta permeabilidad intrínseca de $\alpha 7$ al Ca^{+2} en comparación con otras subunidades nicotínicas, probablemente se amortigüe en mayor medida la reducción de la permeabilidad al ion divalente, disminuyendo para $\alpha 7\beta 2$ en comparación al receptor homomérico, pero manteniéndose relativamente elevada. Existe un único reporte sobre un modelo predictivo teórico que presume una menor permeabilidad al Ca^{+2} en los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor $\alpha 7$, pero el mismo fue realizado con algunos ordenamientos estequiométricos incorrectos, pues se consideró la activación por interfaces $\alpha 7/\beta 2$ en lugar de las $\alpha 7/\alpha 7$ (Fucile, 2017). Serán necesarios futuros estudios para clarificar la influencia de las subunidades $\beta 2$ en la permeabilidad al Ca^{+2} de los receptores $\alpha 7\beta 2$. Finalmente, al considerar de forma integrada todos los aspectos mencionados, es posible destacar que entre los nAChRs heteroméricos que contienen subunidades $\beta 2$, la presencia de subunidades $\alpha 7$ le otorga al receptor $\alpha 7\beta 2$ un comportamiento funcional único, con propiedades intermedias entre el homopentámero de $\alpha 7$ y los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$.

Aunque los únicos receptores $\alpha 7$ heteroméricos identificados en el SNC son del subtipo $\alpha 7\beta 2$, se diseñaron concatámeros de los **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 4$** con estequiometrías análogas para determinar el impacto diferencial de la presencia de **distintas subunidades β** en el pentámero de $\alpha 7$. Se optó por la subunidad $\beta 4$ porque un estudio previo reportó una asociación entre $\alpha 7$ y $\beta 4$ por inmunoprecipitación, observando cierto enlentecimiento en la cinética de la corriente macroscópica al coexpresar ambas subunidades en ovocitos (Criado *et al.*, 2012). Los receptores concataméricos con una y dos subunidades $\beta 4$ alternadas resultaron funcionales, siendo el primer reporte inequívoco acerca de la funcionalidad de $\alpha 7\beta 4$ en un sistema de expresión heterólogo. En cambio, el receptor con tres subunidades $\beta 4$ consecutivas flanqueadas por dos subunidades $\alpha 7$ en el ordenamiento lineal no resultó funcional, a diferencia del receptor $\alpha 7\beta 2$ análogo. Este resultado no permite aseverar la inexistencia de una estequiometría funcional de tres subunidades $\beta 4$, dado que sólo se evaluó un único arreglo lineal. Se requerirá del diseño de nuevos constructos con las subunidades $\beta 4$ consecutivas o no y en distinta disposición, ya que esto influye en la tasa de expresión del receptor, y además porque se desconoce si la interfaz $\alpha 7/\beta 4$ puede mediar activación eficaz en estos receptores. De todos modos, los resultados aquí expuestos evidenciaron por primera vez dos estequiometrías de $\alpha 7\beta 4$ funcionales, sustentando aún más la potencial existencia *in vivo* de receptores $\alpha 7$ heteroméricos adicionales al subtipo $\alpha 7\beta 2$.

Respecto de la **cinética**, la presencia de subunidades $\beta 4$ en el pentámero prolongó la duración de las aperturas de forma similar a las subunidades $\beta 2$, pero su efecto más perceptible fue la inducción de numerosos episodios de activación sostenidos en *bursts* (~8-10 ms), superiores a los de los

receptores $\alpha 7\beta 2$. Llamativamente, la duración de los *bursts* no exhibió diferencias significativas en función del número de subunidades $\beta 4$, a diferencia de $\alpha 7\beta 2$ donde resultó el parámetro cinético más sensible, aumentando exponencialmente. Como no pudo determinarse el impacto de la presencia de tres subunidades $\beta 4$ en el pentámero, se requerirán futuros estudios para clarificar dicho fenómeno. Ambas subunidades β produjeron un enlentecimiento en la cinética del receptor disminuyendo la velocidad de desensibilización, pero el efecto de $\beta 4$ resultó más notorio en términos de frecuencia o proporción de *bursts* inducidos.

Respecto de la **amplitud**, la incorporación de subunidades $\beta 4$ en el pentámero aumentó marcadamente este parámetro en contraste con $\beta 2$, aportando cada subunidad ~ 4 pA adicionales al valor de amplitud máxima del receptor $\alpha 7$ homomérico. Dado que presenta tres residuos polares y/o con carga negativa en el ICD (D, Q y E), la subunidad $\beta 4$ también es HC. La única diferencia con $\alpha 7$ y $\beta 2$ es el residuo de ácido aspártico, el cual, si bien mantiene la polaridad y la carga negativa del anillo intracelular, tal vez le incrementa la conductancia unitaria. De todos modos, es también probable que estén influyendo otros determinantes de conductancia localizados en distintos segmentos del receptor, independientemente del ICD.

Por lo tanto, a diferencia de $\alpha 7\beta 2$, que mantiene particularidades de $\alpha 7$ con una influencia moderada de las subunidades $\beta 2$, el receptor heteromérico $\alpha 7\beta 4$ exhibe un comportamiento funcional con una influencia más profunda y radical de las subunidades $\beta 4$, distanciándose de las características propias de $\alpha 7$ y tornándose semejante al perfil de un receptor $\beta 4$ heteromérico como $\alpha 4\beta 4$. Estos últimos exhiben corrientes macroscópicas evocadas por la ACh de mayor amplitud y menor velocidad de decaimiento o desensibilización que los receptores $\alpha 4\beta 2$ (Fenster *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2006). El origen molecular de dichas diferencias a nivel macroscópico radica en una mayor conductancia unitaria y un mayor tiempo de estado abierto de los receptores $\alpha 4\beta 4$ en comparación a los $\alpha 4\beta 2$ (Liu, Kuo, *et al.*, 2015). En línea con lo reportado para $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$, de igual manera se percibe el impacto diferencial de la presencia de las distintas subunidades β en el arreglo pentamérico de $\alpha 7$ entre $\alpha 7\beta 4$ y $\alpha 7\beta 2$, con un efecto más marcado por parte de $\beta 4$ con respecto a $\beta 2$, y en un contexto funcional notoriamente más complejo que el de los receptores $\alpha 4$, ya que las subunidades $\alpha 7$ por sí mismas exhiben propiedades farmacológicas muy peculiares, incluyendo su capacidad de formar receptores homoméricos y su rápida cinética de activación y desensibilización.

Retomando con los **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$** , también se examinó la **activación alostérica** por agonistas alostéricos del receptor $\alpha 7$, ya que no han sido identificado fármacos selectivos de $\beta 2$ con estas cualidades hasta el presente. El 4BP-TQS activó alostéricamente al receptor heteromérico en su estequiometría de tres subunidades $\beta 2$, sin diferencias significativas con el receptor $\alpha 7$ homomérico, no siendo selectivo ni permitiendo distinguir entre ambos subtipos de

receptores. Como se explicó en la parte I del capítulo I, este compuesto requeriría de dos sitios para mediar la activación, uno en el ECD y otro en el TMD, siendo este último compartido con los PAMs tipo II, dado que también se comporta como tal en presencia de agonistas ortostéricos (Horenstein *et al.*, 2016). Al analizar la secuencia de aminoácidos del TMD de la subunidad $\beta 2$ con respecto a la de $\alpha 7$ se observa una leucina en la posición 254 en lugar de una metionina. Llamativamente, el mutante $\alpha 7$ M254L resulta insensible a la activación por 4BP-TQS, pues la metionina es determinante estructural de la activación alostérica (Gill *et al.*, 2011). Esto permite concluir que el 4BP-TQS activó al receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ únicamente por unión a las subunidades $\alpha 7$ y no a las $\beta 2$, siendo suficientes al menos dos subunidades $\alpha 7$ para mediar la activación alostérica efectiva.

En relación a la **modulación alostérica positiva**, los PAMs habían sido originariamente considerados como “selectivos” para el receptor $\alpha 7$ homomérico, dado el desconocimiento de la existencia de receptores $\alpha 7$ heteroméricos. Por esta razón, actualmente resulta imprescindible explorar también las bases moleculares del accionar de estos compuestos sobre los receptores $\alpha 7\beta 2$. Si bien los dos tipos de PAMs potenciaron tanto al receptor $\alpha 7$ homomérico como heteromérico, lo hicieron de forma diferencial. Por un lado, en el caso de los prototipos de **PAM tipo I**, la potenciación disminuyó progresivamente al aumentar el número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero, siendo por ejemplo prácticamente nula para el 5-HI en la estequiometría $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$. Esta reducción de la potenciación se observó tanto a nivel de corrientes macroscópicas como unitarias. Por otro lado, el prototipo de **PAM tipo II** PNU-120596 potenció por igual a las distintas estequiometrías del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ y al homomérico $\alpha 7$ a nivel macroscópico y microscópico. En todos los casos se observaron los típicos *clusters* de duración superior al segundo, tal como ocurrió con el agonista alostérico 4BP-TQS que también puede actuar como PAM tipo II. Tanto es así que el PNU-120596 fue seleccionado como PAM para la estrategia de *electrical fingerprinting*, de modo tal de potenciar igualmente a todas las estequiometrías, generando eventos suficientes que definan con precisión las clases de amplitud. Un único estudio previo de corrientes macroscópicas con subunidades no concatenadas había reportado también la capacidad de este modulador para potenciar al receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ (Thomsen *et al.*, 2015).

Es posible concluir que los PAMs tipo I resultaron más selectivos sobre el receptor homomérico $\alpha 7$ que sobre el receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$, reduciéndose el grado de potenciación en función del número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero. En contraposición, los PAMs tipo II no exhibieron un comportamiento selectivo, sino que potenciaron en igual grado o magnitud a los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos, enmascarando las diferencias cinéticas intrínsecas de los distintos subtipos de receptores e impidiendo la distinción de los mismos. Por lo tanto, durante el desarrollo y optimización de nuevos PAMs para $\alpha 7$ también deben considerarse los efectos sobre la contraparte

heteromérica del receptor, ya que ambos subtipos de receptores probablemente desempeñan roles fisiológicos diferenciales, y las estrategias terapéuticas podrán apuntar a la potenciación de ambos o de uno de ellos de forma selectiva.

El accionar diferencial de ambos tipos de PAMs sobre el receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ con respecto al receptor $\alpha 7$ homomérico puede deberse a distintas causas. Por un lado, puede pensarse que los PAMs tipo II podrían unirse tanto a las subunidades $\alpha 7$ como a las $\beta 2$ logrando potenciar a todos los receptores por igual, mientras que los PAMs tipo I sólo podrían unirse a las subunidades $\alpha 7$, perdiendo la capacidad de potenciación cuanto mayor sea el número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero. Sin embargo, esta explicación no resulta factible porque los PAMs tipo II no potencian otros nAChRs con subunidades $\beta 2$, y además estas contienen una leucina en la posición 254, tornándolas insensibles al PNU-120596 y al 4BP-TQS, de forma análoga a lo observado en el mutante $\alpha 7$ M254L (Young *et al.*, 2008; DaCosta *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2011). Esto implica que la potenciación por ambos tipos de PAMs requiere necesariamente de las subunidades $\alpha 7$. Por otro lado, los distintos tipos de PAMs podrían requerir de diferente número de subunidades $\alpha 7$ para ejercer efectivamente la máxima potenciación, de acuerdo a la localización de sus sitios alostéricos de unión. Los PAMs tipo I ejercieron el mayor efecto al estar presentes las cinco subunidades $\alpha 7$ en el pentámero y la potenciación se redujo hasta ser mínima o nula en la estequiometría con dos subunidades $\alpha 7$. Contrariamente, los PAMs tipo II ejercieron la máxima potenciación independientemente del número de subunidades $\alpha 7$ disponibles en el receptor. Hasta el presente existe un único reporte sobre la estequiometría de la potenciación por PNU-120596, donde se postuló que el compuesto requería de cuatro a cinco subunidades $\alpha 7$ WT para potenciar eficazmente (DaCosta y Sine, 2013). En contraste, los resultados aquí expuestos demostraron que tan sólo dos subunidades $\alpha 7$, como en el caso de $(\alpha 7)_2(\beta 2)_3$, son suficientes para que el PNU-120596 ejerza su máximo efecto. Esta aparente controversia podría radicar en el desconocimiento fehaciente del sitio alostérico de unión, ya que, si bien el mismo es sin duda una cavidad transmembrana, originariamente se consideró a la misma intrasubunidad (Young *et al.*, 2008; DaCosta *et al.*, 2011), y posteriormente intersubunidad (Newcombe *et al.*, 2018). Ese estudio previo utilizó subunidades $\alpha 7$ TSLMF para inhabilitar los determinantes estructurales del PNU-120596 considerando a la cavidad transmembrana como intrasubunidad (DaCosta y Sine, 2013), pero si en realidad el PAM se uniera a una cavidad intersubunidad, la quintuple mutante perjudicaría la unión en las interfaces transmembrana en ambas caras con las subunidades adyacentes, explicando por qué se requirió de un alto número de subunidades $\alpha 7$ WT en el pentámero para observar potenciación. En este caso, en los receptores $\alpha 7\beta 2$ quizás el PNU-120596 aún puede unirse en cavidades intersubunidad donde las subunidades $\beta 2$ aporten al menos algunos de los determinantes estructurales, como la alanina en posición 226, mientras que el resto sean provistos por la subunidad $\alpha 7$. De ese modo, pese al bajo número de

subunidades $\alpha 7$ en el pentámero, habría más sitios de unión disponibles para el PAM tipo II, posibilitando que este igualmente ejerza su máximo efecto potenciador como se describió en la presente parte del capítulo.

Además, sin necesidad de conocer de forma inequívoca la localización de los sitios de unión alostéricos, se desprende de estas observaciones que la presencia de subunidades $\beta 2$ en el pentámero impacta diferencialmente en la disponibilidad de los determinantes estructurales de potenciación para cada tipo de PAM. En el capítulo I se demostró, utilizando el receptor $\alpha 7$ TSLMF, que los PAMs tipo I comparten determinantes estructurales transmembrana con los PAMs tipo II, siendo el 5-HI el menos sensible y exhibiendo el NS-1738 una mayor sensibilidad, con un comportamiento intermedio más semejante al del PNU-120596 (Young *et al.*, 2008; DaCosta *et al.*, 2011; Andersen *et al.*, 2016). Casualmente, los resultados aquí expuestos sobre la modulación alostérica del receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ según aumentó el número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero fueron opuestos, ya que el PNU-120596 mantuvo sus niveles de potenciación, el 5-HI fue el menos capaz de potenciar, y si bien el NS-1738 también sufrió disminución de su capacidad potenciadora, la reducción fue en menor medida que la experimentada por el otro prototipo de PAM I. Esto refuerza la teoría de que la subunidad $\beta 2$ conserva algunos de los determinantes estructurales transmembrana de la potenciación esenciales para los PAMs tipo II, como la A226, pero que a la vez carece de otros residuos más determinantes para la potenciación por los PAMs tipo I, como, por ejemplo, a nivel del ECD o de la interfaz ECD-TMD, lo que explicaría la afectación diferencial de la capacidad potenciadora de ambos tipos de PAMs. Se requerirá de la obtención de estructuras cristalográficas del receptor $\alpha 7$ en presencia de los PAMs para identificar la localización exacta de sus sitios alostéricos de unión, y de ese modo comprender las diferencias de su accionar entre $\alpha 7$ y $\alpha 7\beta 2$.

También es posible que el efecto diferencial de los PAMs tipo I y II sobre los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos esté vinculado a sus mecanismos moleculares de acción distintivos. En la parte I del capítulo I se mencionó que los episodios de activación sostenidos del receptor $\alpha 7$ inducidos por los PAMs tipo I probablemente eran consecuencia de una disminución en la barrera energética entre los estados cerrado y abierto, y/o de un incremento en la barrera energética entre los estados abierto y desensibilizado; mientras que en el caso de los PAMs tipo II, la desestabilización del estado desensibilizado se traducía en una disminución de la velocidad por la cual el estado abierto pasa al estado desensibilizado, y/o en un aumento de la velocidad por la cual el receptor desensibilizado se reactiva pasando nuevamente al estado abierto. Si bien no es posible descartar que los prototipos de PAMs ejerzan distintos mecanismos de acción en los receptores heteroméricos, el efecto estuvo mediado principalmente a través de las subunidades $\alpha 7$, por lo cual es probable que los mecanismos de acción estén conservados. Sin embargo, la presencia de subunidades $\beta 2$ podría estar afectando diferencialmente a ambos mecanismos de acción, ya que la introducción de la misma en el

pentámero genera de por sí una menor velocidad de desensibilización y la inducción de episodios de activación en *bursts*. En el caso de los PAMs tipo I, el efecto potenciador implica cambios mínimos o prácticamente nulos en la cinética del receptor, que se verían mayormente eclipsados por la disminución de la velocidad de desensibilización originada por las subunidades $\beta 2$. En cambio, los PAMs tipo II inducen una disminución de la velocidad de desensibilización junto con reactivación desde el estado desensibilizado mucho más marcadas que el efecto cinético generado por las subunidades $\beta 2$, enmascarando las diferencias cinéticas intrínsecas entre los receptores y predominando el efecto potenciador sobre todos por igual.

En resumen, la modulación alostérica positiva del receptor $\alpha 7\beta 2$ por PAMs tipo I y II resulta diferencial probablemente por la conjunción de todas o varias de las posibles causas discutidas anteriormente, ya que la localización de los sitios alostéricos de unión, el número requerido de los mismos, los determinantes estructurales que posean y los mecanismos de acción a nivel molecular están estrechamente relacionados para que la potenciación efectivamente ocurra. Es así que los resultados aquí expuestos sientan un precedente para la exploración de nuevos aspectos de la potenciación de receptores $\alpha 7$, demostrando que es posible una modulación selectiva de los receptores homoméricos con respecto a los heteroméricos $\alpha 7\beta 2$, posibilitando el diseño y desarrollo de ligandos más específicos.

En síntesis, a la rápida cinética de activación y desensibilización característica del receptor $\alpha 7$ homomérico, que actúa como mecanismo de defensa frente a la estimulación excesiva, se contrapone la cinética más lenta del **receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$** , donde la incorporación de subunidades $\beta 2$ al pentámero disminuye la velocidad de desensibilización, prolongando las aperturas e induciendo episodios de activación sostenidos en *bursts*. Estos constituyen entonces la marca o huella cinética distintiva que permite diferenciarlo del receptor $\alpha 7$ homomérico. Por lo tanto, ambos subtipos de receptores $\alpha 7$ actuarían *in vivo* a **distinta escala temporal** y con un **patrón espacial** común en ciertas regiones del SNC, lo que tendría un impacto notorio a nivel de la señalización intracelular por iones Ca^{+2} y de la excitabilidad neuronal. Estas propiedades funcionales distintivas le permitirían al receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ ejercer un **rol fisiológico clave** en la modulación colinérgica de circuitos neuronales específicos, el cual aún no ha sido completamente dilucidado, emergiendo como un novedoso campo de interés en investigación y en el desarrollo de ligandos específicos.

CONCLUSIONES PARCIALES: CAPÍTULO II

La subunidad $\alpha 7$ es capaz de generar **receptores heteroméricos funcionales**, como el subtipo **$\alpha 7\beta 2$** , identificado en sistemas nativos y caracterizado en sistemas heterólogos:

- Las **estequiometrías** que contienen una, dos o tres subunidades $\beta 2$ en el pentámero dan lugar a receptores $\alpha 7\beta 2$ funcionales.

- En la **activación ortostérica** del receptor $\alpha 7\beta 2$ por el agonista endógeno ACh, a medida que aumenta progresivamente el número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero se observa que:

- La amplitud y la conductancia unitaria se mantienen constantes.

- La cinética del receptor se enlentece por la disminución en la velocidad de desensibilización:

- ✓ Aumenta linealmente el tiempo de estado abierto o la duración de las aperturas individuales.

- ✓ Aumenta exponencialmente la duración de los episodios de activación sostenidos en *bursts*, los cuales constituyen la marca cinética distintiva de los receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$.

- La única **interfaz de activación** efectiva es $\alpha 7/\alpha 7$, por lo que $\beta 2$ no actúa como subunidad complementaria para formar el sitio de unión ortostérico.

- La **activación alostérica** del receptor $\alpha 7\beta 2$ no presenta diferencias con la del receptor $\alpha 7$ homomérico, enmascarando las diferencias cinéticas que se perciben entre ambos subtipos de receptores en la activación ortostérica.

- Los PAMs desarrollados para el receptor $\alpha 7$ homomérico también producen **modulación alostérica positiva** del receptor $\alpha 7\beta 2$ heteromérico, pero de forma diferencial:

- Los **PAMs tipo I** resultan más selectivos para el receptor $\alpha 7$ homomérico, disminuyendo la potenciación a medida que aumenta el número de subunidades $\beta 2$ en el pentámero. El efecto es prácticamente nulo en la estequiometría de tres subunidades $\beta 2$.

- Los **PAMs tipo II** no son selectivos, sino que potencian por igual a los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos, eclipsando sus diferencias cinéticas intrínsecas.

Si en lugar de subunidades $\beta 2$ se incorporan subunidades $\beta 4$ en el pentámero de $\alpha 7$, se forman **receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 4$** funcionales en el sistema de expresión heterólogo empleado, aunque no han sido reportados en sistemas nativos:

- Las estequiometrías con una y dos subunidades $\beta 4$ son funcionales.

- En la activación ortostérica por el agonista endógeno ACh, a medida que aumenta el número de subunidades $\beta 4$ en el pentámero se observa que:

- La amplitud de las corrientes unitarias aumenta, a diferencia de lo que ocurre con $\beta 2$.
- El tiempo de estado abierto y la inducción de episodios de activación sostenidos en *bursts* se incrementan, al igual que con la subunidad $\beta 2$, pero de forma más notoria, aumentando principalmente en frecuencia.

En el **capítulo II** se dilucidaron los mecanismos de activación y modulación alostérica positiva del **receptor $\alpha 7\beta 2$ heteromérico** a nivel molecular. Este receptor exhibió un comportamiento funcional único y distintivo, con una prolongada activación y una desensibilización reducida, conservando algunas de las características propias de las subunidades $\alpha 7$, pero con la influencia de las subunidades $\beta 2$. Esto le confirió al receptor $\alpha 7\beta 2$ un perfil intermedio entre los receptores $\alpha 7$ homoméricos y $\beta 2$ heteroméricos. Contrariamente, la incorporación de subunidades $\beta 4$ en el pentámero ejerció un impacto más marcado, alejando al receptor del perfil $\alpha 7$ homomérico y tornándolo más semejante al de los receptores $\beta 4$ heteroméricos. La funcionalidad de los receptores $\alpha 7\beta 4$ en el sistema de expresión heterólogo empleado, junto con otras evidencias experimentales, sustentan la potencial presencia de este receptor *in vivo*, abriendo puertas acerca de la existencia de otros receptores $\alpha 7$ heteroméricos, además del subtipo $\alpha 7\beta 2$ ya identificado. Por lo tanto, la información aportada en este capítulo provee bases moleculares fundamentales que contribuyen a la dilucidación del rol fisiológico diferencial del receptor $\alpha 7\beta 2$ heteromérico en los circuitos neuronales asociados a cognición y memoria, y a la comprensión de su relevancia a nivel fisiopatológico y en el desarrollo de nuevos ligandos más específicos.

CONCLUSIONES GENERALES



CONCLUSIONES GENERALES

La señalización colinérgica por la ACh constituye uno de los principales sistemas de neuromodulación de los circuitos neuronales del SNC, ya que coordina la respuesta de grupos de neuronas localizados en diversas áreas del encéfalo, incluyendo el cerebro anterior basal, el hipocampo, la corteza y el sistema límbico, para posibilitar funciones superiores como cognición, memoria, aprendizaje, atención, recompensa y procesamiento selectivo de la información sensorial. La neuromodulación resulta sumamente compleja de descifrar, dada la dinámica espaciotemporal de liberación de la ACh, y el elevado número de comportamientos, circuitos, poblaciones neuronales y receptores colinérgicos que se encuentran involucrados en la mediación de efectos a corto y a largo plazo. La mayoría de estos aspectos no han podido ser dilucidados y menos aún integrados, por lo tanto, el estudio de la **función molecular de los receptores** que median el efecto neuromodulador de la ACh resulta crucial. Además, numerosos desórdenes neurológicos y neurodegenerativos se presentan con disfunciones o fallas en el sistema de neuromodulación colinérgico, por lo cual, un mejor entendimiento del mismo permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Es así que los **receptores nicotínicos** ionotrópicos constituyen una pieza fundamental en el sistema de neuromodulación colinérgico del encéfalo. Cada subtipo de receptor nicotínico presenta una estequiometría definida, responsable de las propiedades biofísicas, farmacológicas y funcionales que se encuentran íntimamente relacionadas con su rol fisiológico diferencial. Los dos subtipos mayoritarios de nAChRs en el SNC son el receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$ y el receptor homomérico $\alpha 7$. Sin embargo, recientemente se demostró la existencia de receptores $\alpha 7\beta 2$ heteroméricos en áreas discretas del encéfalo, principalmente en cerebro anterior basal, desde donde se proyecta el mayor número de neuronas colinérgicas del sistema de neuromodulación. En el presente trabajo de tesis se descifraron aspectos clave de la **función molecular de los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos**, específicamente las **bases moleculares de su activación y modulación alostérica**.

Respecto de la **activación ortostérica** por ACh, el receptor $\alpha 7$ homomérico presenta una cinética de activación y desensibilización muy rápidas, probablemente como mecanismo de defensa frente a una posible estimulación excesiva. Además, su rol dual ionotrópico/metabotrópico le permite transformar esa corriente iónica transitoria en un evento sostenido a través de las vías de señalización intracelulares. Por su parte, la incorporación de subunidades $\beta 2$ en el arreglo pentamérico le otorga al receptor heteromérico $\alpha 7\beta 2$ una cinética más lenta, con una activación prolongada y una desensibilización reducida, que le permite inducir episodios de activación sostenidos o *bursts*. Ese efecto de las subunidades $\beta 2$ a nivel cinético es consistente con el observado en los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ de menor velocidad de desensibilización. Sin embargo, la conductancia unitaria, la sensibilidad a la ACh y la interfaz de activación se mantuvieron sin cambios con respecto al receptor

homomérico, a diferencia de lo que ocurre en $\alpha 4\beta 2$ donde $\beta 2$ actúa como una subunidad complementaria propiamente dicha. Por lo tanto, es posible inferir que el receptor $\alpha 7\beta 2$ constituye un subtipo de nAChR con un perfil intermedio entre los receptores homoméricos $\alpha 7$ y heteroméricos $\alpha 4\beta 2$.

Por su parte, la **activación y modulación alostéricas** constituyen potenciales estrategias terapéuticas que también exhiben efectos diferenciales entre los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos. Los PAMs tipo II potencian por igual a ambos subtipos de receptores, porque inducen cambios cinéticos tan pronunciados que enmascaran las diferencias cinéticas intrínsecas entre los mismos. Los agonistas que producen activación alostérica presentan un comportamiento similar, pues también actúan como PAMs tipo II. Por el contrario, los PAMs tipo I pierden progresivamente su efecto potenciador ante la presencia de subunidades $\beta 2$, siendo más selectivos para el receptor $\alpha 7$ homomérico. Además, como ejercen potenciación de forma moderada y con menor riesgo de citotoxicidad, resultan más promisorios desde el punto de vista clínico. En la presente tesis se identificaron novedosos compuestos naturales y sintéticos con actividad de PAM tipo I, los cuales por sí mismos pueden exhibir potencialidad terapéutica o funcionar como plataforma para el diseño y optimización de nuevos ligandos más específicos.

En consecuencia, la estequiometría y el arreglo espacial de las subunidades de ambos subtipos de receptores $\alpha 7$ determinan sus propiedades funcionales distintivas, tanto a nivel biofísico como farmacológico. Estos hallazgos sugieren que los **receptores $\alpha 7$ homoméricos y $\alpha 7\beta 2$ heteroméricos** actuarían *in vivo* a distinta **escala temporal** y con un **patrón espacial** común, al menos en algunas áreas discretas del encéfalo, ejerciendo un **impacto diferencial** dentro del sistema de neuromodulación colinérgico que regula los circuitos neuronales asociados a cognición y memoria. El conocimiento aportado acerca de los mecanismos moleculares de activación y modulación alostérica de los receptores $\alpha 7$ homoméricos y heteroméricos contribuye entonces a la dilucidación de su rol fisiológico distintivo, y sienta bases para el diseño y optimización de ligandos potencialmente terapéuticos, ya que dichos receptores neuronales constituyen blancos farmacológicos de gran interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Agnati LF, Guidolin D, Guescini M, Genedani S, y Fuxe K (2010) Understanding wiring and volume transmission. *Brain Res Rev* 64:137-159.
- Ahmad S, She Z, y Kraatz HB (2019) Electrochemical studies of human nAChR $\alpha 7$ subunit phosphorylation by kinases PKA, PKC and Src. *Anal Biochem* 574:46-56.
- Ahring PK, Liao VWY, y Balle T (2018) Concatenated nicotinic acetylcholine receptors: A gift or a curse? *J Gen Physiol* 150:453-473.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, y Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5595.
- Albuquerque EX, Alkondon M, Pereira EFR, Castro NG, Schratzenholz A, Barbosa CT, Bonfante-Cabarcas R, Aracava Y, Eisenberg HM, y Maelicke A (1997) Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther* 280:1117-1136.
- Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, y Rogers SW (2009) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 89:73-120.
- Allen NJ, y Lyons DA (2018) Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 362:181-185.
- Alonso F, Moglie Y, y Radivoy G (2015) Copper Nanoparticles in Click Chemistry. *Acc Chem Res* 48:2516-2528.
- Althoff T, Hibbs RE, Banerjee S, y Gouaux E (2014) X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature* 512:333-337.
- Anand R, Peng X, y Lindstrom J (1993) Homomeric and native $\alpha 7$ acetylcholine receptors exhibit remarkably similar but non-identical pharmacological properties, suggesting that the native receptor is a heteromeric protein complex. *FEBS Lett* 327:241-246.
- Andersen N, Corradi J, Bartos M, Sine SM, y Bouzat C (2011) Functional relationships between agonist binding sites and coupling regions of homomeric Cys-loop receptors. *J Neurosci* 31:3662-3669.
- Andersen N, Corradi J, Sine SM, y Bouzat C (2013) Stoichiometry for activation of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci* 110:20819-20824.
- Andersen N, Nielsen BE, Corradi J, Tolosa MF, Feuerbach D, Arias HR, y Bouzat C (2016) Exploring the Positive Allosteric Modulation of Human $\alpha 7$ Nicotinic Receptors from a Single-Channel Perspective. *Neuropharmacology* 107:189-200.
- Arias HR, Gu R-X, Feuerbach D, Guo B-B, Ye Y, y Wei D-Q (2011) Novel positive allosteric modulators of the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 50:5263-5278.
- Azam L, Winzer-Serhan U, y Leslie FM (2003) Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience* 119:965-977.
- Báez-Pagán CA, Delgado-Vélez M, y Lasalde-Dominicci JA (2015) Activation of the Macrophage $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* 10:468-476.
- Bagdas D, Wilkerson JL, Kulkarni AR, Toma W, AlSharari S, Gul Z, Lichtman AH, Papke RL, Thakur GA, y Damaj MI (2016) The $\alpha 7$ nicotinic receptor dual allosteric agonist and positive allosteric modulator GAT107 reverses nociception in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 173:2506-2520.
- Bagli E, Goussia A, Moschos MM, Agnantis N, y Kitsos G (2016) Natural Compounds and Neuroprotection: Mechanisms of Action and Novel Delivery Systems. *In Vivo* 30:535-547.
- Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, y Darvishi B (2017) Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions. *Biomed Pharmacother* 93:218-229.
- Bakoyiannis I, Daskalopoulou A, Pergialiotis V, y Perrea D (2019) Phytochemicals and cognitive health: Are flavonoids doing the trick? *Biomed Pharmacother* 109:1488-1497.
- Ballinger EC, Ananth M, Talmage DA, y Role LW (2016) Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. *Neuron* 91:1199-1218.
- Bandyopadhyay S, Dutta S, Spilling CD, Dupureur CM, y Rath NP (2008) Synthesis and biological evaluation of a phosphonate analog of the natural acetyl cholinesterase inhibitor cyclophostin. *J Org Chem* 73:8386-8391.
- Baptista-Hon DT, Deeb TZ, Lambert JJ, Peters JA, y Hales TG (2013) The minimum M3-M4 loop length of neurotransmitter-activated pentameric receptors is critical for the structural integrity of cytoplasmic portals. *J Biol Chem* 288:21558-21568.
- Barrantes FJ (2004) Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res Rev* 47:71-95.
- Bartos M, Corradi J, y Bouzat C (2009) Structural basis of activation of Cys-loop receptors: The extracellular-transmembrane interface as a coupling region. *Mol Neurobiol* 40:236-252.
- Beckstein O, y Sansom MSP (2006) A hydrophobic gate in an ion channel: The closed state of the nicotinic acetylcholine receptor. *Phys Biol* 3:147-159.
- Benallegue N, Mazzaferro S, Alcaïno C, y Bermudez I (2013) The additional ACh binding site at the $\alpha 4(+)/\alpha 4(-)$ interface of the $(\alpha 4\beta 2)2\alpha 4$ nicotinic ACh receptor contributes to desensitization. *Br J Pharmacol* 170:304-316.
- Bertrand D, Bertrand S, Cassar S, Gubbins E, Li J, y Gopalakrishnan M (2008) Positive Allosteric Modulation of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor: Ligand Interactions with Distinct Binding Sites and Evidence for a Prominent Role of the M2-M3 Segment. *Mol Pharmacol* 74:1407-1416.
- Bertrand D, y Gopalakrishnan M (2007) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 74:1155-1163.
- Bian YY, Guo J, Majeed H, Zhu KX, Guo XN, Peng W, y Zhou HM (2015) Ferulic acid renders protection to HEK293 cells against oxidative damage and apoptosis induced by hydrogen peroxide. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 51:722-729.
- Bianchi MT, y Macdonald RL (2001) Mutation of the 9' leucine in the GABAA receptor $\gamma 2L$ subunit produces an apparent decrease in desensitization by stabilizing open states without altering desensitized states. *Neuropharmacology* 41:737-744.

- Blum AP, Van Arnem EB, German LA, Lester HA, y Dougherty DA (2013) Binding interactions with the complementary subunit of nicotinic receptors. *J Biol Chem* 288:6991-6997.
- Boadi WY, Amartey PK, y Lo A (2016) Effect of quercetin, genistein and kaempferol on glutathione and glutathione-redox cycle enzymes in 3T3-L1 preadipocytes. *Drug Chem Toxicol* 39:239-247.
- Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le Poupon C, Changeux J-P, Delarue M, y Corringier P-J (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457:111-114.
- Bodnar AL, Cortes-Burgos LA, Cook KK, Dinh DM, Groppi VE, Hajos M, Higdon NR, Hoffmann WE, Hurst RS, Myers JK, Rogers BN, Wall TM, Wolfe ML, y Wong E (2005) Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* 48:905-908.
- Boffi JC, Marcovich I, Gill JK, Corradi J, Collins T, Lipovsek M, Moglie M, Plazas P V., Craig PO, Millar NS, Bouzat C, y Elgoyhen AB (2017) Differential Contribution of Subunit Interfaces to $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Function. *Mol Pharmacol* 91:250-262.
- Bouzat C (2012) New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *J Physiol Paris* 106:23-33.
- Bouzat C, Bartos M, Corradi J, y Sine SM (2008) The interface between extracellular and transmembrane domains of homomeric Cys-loop receptors governs open-channel lifetime and rate of desensitization. *J Neurosci* 28:7808-7819.
- Bouzat C, Bren N, y Sine SM (1994) Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron* 13:1395-1402.
- Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang HL, Rayes D, Hansen SB, Taylor P, y Sine SM (2004) Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* 430:896-900.
- Bouzat C, Lasala M, Nielsen BE, Corradi J, y Esandi M del C (2018) Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. *J Physiol* 596:1847-1861.
- Bozorov K, Zhao J, y Aisa HA (2019) 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorg Med Chem* 27:3511-3531.
- Broad LM, Zwart R, Pearson KH, Lee M, Wallace L, McPhie GI, Emkey R, Hollinshead SP, Dell CP, Baker SR, y Sher E (2006) Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators. *J Pharmacol Exp Ther* 318:1108-1117.
- Bürli T, Baer K, Ewers H, Sidler C, Fuhrer C, y Fritschy J-M (2010) Single Particle Tracking of $\alpha 7$ Nicotinic AChR in Hippocampal Neurons Reveals Regulated Confinement at Glutamatergic and GABAergic Perisynaptic Sites. *PLoS One* 5:e11507.
- Calimet N, Simoes M, Changeux J-P, Karplus M, Taly A, y Cecchini M (2013) A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci* 110:E3987-E3996.
- Carbone AL, Moroni M, Groot-Kormelink PJ, y Bermudez I (2009) Pentameric concatenated $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ and $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ nicotinic acetylcholine receptors: subunit arrangement determines functional expression. *Br J Pharmacol* 156:970-981.
- Celie PHN, Van Rossum-Fikkert SE, Van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, y Sixma TK (2004) Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41:907-914.
- Changeux J-P (2010) Allosteric Receptors: From Electric Organ to Cognition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:1-38.
- Changeux J-P, y Christopoulos A (2016) Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. *Cell* 166:1084-1102.
- Charpantier E, Wiesner A, Huh K-H, Ogier R, Hoda J-C, Allaman G, Raggenbass M, Feuerbach D, Bertrand D, y Fuhrer C (2005) Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J Neurosci* 25:9836-9849.
- Chatzidaki A, D'Oyley JM, Gill JK, Sheppard TD, y Millar NS (2015) The influence of allosteric modulators and transmembrane mutations on desensitisation and activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 97:75-85.
- Chatzidaki A, y Millar NS (2015) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 97:408-417.
- Cheng X, Ivanov I, Wang HL, Sine SM, y McCammon JA (2007) Nanosecond-timescale conformational dynamics of the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J* 93:2622-2634.
- Cheng X, Lu B, Grant B, Law RJ, y McCammon JA (2006) Channel opening motion of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as suggested by normal mode analysis. *J Mol Biol* 355:310-324.
- Chimienti F, Hogg RC, Plantard L, Lehmann C, Brakch N, Fischer J, Huber M, Bertrand D, y Hohl D (2003) Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum Mol Genet* 12:3017-3024.
- Cho CH, Song W, Leitzell K, Teo E, Meleth AD, Quick MW, y Lester RAJ (2005) Rapid upregulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine dephosphorylation. *J Neurosci* 25:3712-3723.
- Collins T, y Millar NS (2010) Nicotinic Acetylcholine Receptor Transmembrane Mutations Convert Ivermectin from a Positive to a Negative Allosteric Modulator. *Mol Pharmacol* 78:198-204.
- Collins T, Young GT, y Millar NS (2011) Competitive binding at a nicotinic receptor transmembrane site of two $\alpha 7$ -selective positive allosteric modulators with differing effects on agonist-evoked desensitization. *Neuropharmacology* 61:1306-1313.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, y Dartigues JF (2000) Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 16:357-363.
- Conroy WG (2003) Potentiation of alpha7-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors by Select Albumins. *Mol Pharmacol* 63:419-428.
- Corcoran MP, McKay DL, y Blumberg JB (2012) Flavonoid Basics: Chemistry, Sources, Mechanisms of Action, and Safety. *J Nutr Gerontol Geriatr* 31:176-189.
- Corradi J, y Bouzat C (2016) Understanding the Bases of Function and Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol Pharmacol* 90:288-299.
- Corradi J, y Bouzat C (2014) Unraveling Mechanisms Underlying Partial Agonism in 5-HT3A Receptors. *J Neurosci*

- 34:16865-16876.
- Corradi J, Gumilar F, y Bouzat C (2009) Single-channel kinetic analysis for activation and desensitization of homomeric 5-HT_{3A} receptors. *Biophys J* 97:1335-1345.
- Corringer P-J, Le Novère N, y Changeux J-P (2000) Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431-458.
- Criado M, Valor LM, Mulet J, Gerber S, Sala S, y Sala F (2012) Expression and functional properties of $\alpha 7$ acetylcholine nicotinic receptors are modified in the presence of other receptor subunits. *J Neurochem* 123:504-514.
- DaCosta CJB, y Baenziger JE (2009) A lipid-dependent uncoupled conformation of the acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 284:17819-17825.
- DaCosta CJB, y Baenziger JE (2013) Gating of pentameric ligand-gated ion channels: Structural insights and ambiguities. *Structure* 21:1271-1283.
- DaCosta CJB, Free CR, Corradi J, Bouzat C, y Sine SM (2011) Single-channel and structural foundations of neuronal $\alpha 7$ acetylcholine receptor potentiation. *J Neurosci* 31:13870-9.
- DaCosta CJB, Free CR, y Sine SM (2015) Stoichiometry for α -bungarotoxin block of $\alpha 7$ acetylcholine receptors. *Nat Commun* 6:8057-8067.
- DaCosta CJB, y Sine SM (2013) Stoichiometry for drug potentiation of a pentameric ion channel. *Proc Natl Acad Sci* 110:6595-6600.
- Dajas-Bailador F, Abin-Carriquiry JA, Arredondo F, Echeverry C, y Felicia R-M (2013) Neuroprotective Actions of Flavones and Flavonols: Mechanisms and Relationship to Flavonoid Structural Features. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 13:30-35.
- Dajas-Bailador F, y Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25:317-324.
- Dani JA, y Bertrand D (2007) Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:699-729.
- Davies KA, Abel RC, y Wulff JE (2009) Operationally simple copper-promoted coupling of terminal alkynes with benzyl halides. *J Org Chem* 74:3997-4000.
- de Jonge WJ, y Ulloa L (2007) The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 151:915-929.
- de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud H-R, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, y Boeckxstaens GE (2005) Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 6:844-851.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, y Crozier A (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid Redox Signal* 18:1818-1892.
- Descarries L, Gisiger V, y Steriade M (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53:603-625.
- Dey R, y Chen L (2011) In search of allosteric modulators of $\alpha 7$ -nAChR by solvent density guided virtual screening. *J Biomol Struct Dyn* 28:695-715.
- Dheer D, Singh V, y Shankar R (2017) Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg Chem* 71:30-54.
- Di Cesare Mannelli L, Tenci B, Zanardelli M, Failli P, y Ghelardini C (2015) $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Promotes the Neuroprotective Functions of Astrocytes against Oxaliplatin Neurotoxicity. *Neural Plast* 2015:1-10.
- Dineley KT, Pandya AA, y Yakel JL (2015) Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 36:96-108.
- Dineley KT, y Patrick J (1992) Gene transcripts for the nicotinic acetylcholine receptor subunit, beta4, are distributed in multiple areas of the rat central nervous system. *Mol Brain Res* 16:339-344.
- Dinklo T, Shaban H, Thuring JW, Lavreysen H, Stevens KE, Zheng L, Mackie C, Grantham C, Vandenberk I, Meulders G, Peeters L, Verachtert H, De Prins E, y Lesage ASJ (2011) Characterization of 2-[[4-fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]-4-(4-pyridinyl)-5-thiazolemethanol (JNJ-1930942), a novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 336:560-574.
- Donvito G, Bagdas D, Toma W, Rahimpour E, Jackson A, Meade JA, AlSharari S, Kulkarni AR, Ivy Carroll F, Lichtman AH, Papke RL, Thakur GA, y Imad Damaj M (2017) The interaction between $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and nuclear peroxisome proliferator-activated receptor- α represents a new antinociceptive signaling pathway in mice. *Exp Neurol* 295:194-201.
- Dunlop J, Lock T, Jow B, Sitzia F, Grauer S, Jow F, Kramer A, Bowlby MR, Randall AD, Kowal D, Gilbert A, Comery TA, LaRocque J, Soloveva V, Brown JT, y Roncarati R (2009) Old and New Pharmacology: Positive Allosteric Modulation of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor by the 5-Hydroxytryptamine_{2B/C} Receptor Antagonist SB-206553 (3,5-Dihydro-5-methyl-N-3-pyridinylbenzo[1,2-b:4,5-b']di pyrrole-1(2H)-carboxamide). *J Pharmacol Exp Ther* 328:766-776.
- Ebrahimi A, y Schluesener H (2012) Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. *Ageing Res Rev* 11:329-345.
- Echeverry C, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Midiwo JO, Ochieng C, Kerubo L, y Dajas-Bailador F (2010) Pretreatment with Natural Flavones and Neuronal Cell Survival after Oxidative Stress: A Structure-Activity Relationship Study. *J Agric Food Chem* 58:2111-2115.
- Egea J, Buendia I, Parada E, Navarro E, León R, y Lopez MG (2015) Anti-inflammatory role of microglial $\alpha 7$ nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochem Pharmacol* 97:463-472.
- Eiselé JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Changeux J-P, y Bertrand D (1993) Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366:479-483.
- El-Hajj RA, McKay SB, y McKay DB (2007) Pharmacological and immunological identification of native $\alpha 7$ nicotinic receptors: Evidence for homomeric and heteromeric $\alpha 7$ receptors. *Life Sci* 81:1317-1322.
- El Kouhen R, Hu M, Anderson D, Li J, y Gopalakrishnan M (2009) Pharmacology of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor mediated extracellular signal-regulated kinase signalling in PC12 cells. *Br J Pharmacol* 156:638-648.
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin C V., Heinemann SF, y

- Boulter J (2001) α 10: A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci* 98:3501-3506.
- Elnagar MR, Walls AB, Helal GK, Hamada FM, Thomsen MS, y Jensen AA (2018) Functional characterization of α 7 nicotinic acetylcholine and NMDA receptor signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells in an ERK phosphorylation assay. *Eur J Pharmacol* 826:106-113.
- Erickson SS, y Boileau AJ (2007) Tandem couture: Cys-loop receptor concatamer insights and caveats. *Mol Neurobiol* 35:113-127.
- Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, y Fine A (2001) Ultrastructural distribution of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci* 21:7993-8003.
- Faghih R, Gfesser GA, y Gopalakrishnan M (2007) Advances in the discovery of novel positive allosteric modulators of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2:99-106.
- Faghih R, Gopalakrishnan M, y Briggs CA (2008) Allosteric modulators of the α 7 nicotinic acetylcholine receptor. *J Med Chem* 51:701-712.
- Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, y Lester RAJ (1997) Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J Neurosci* 17:5747-5759.
- Flanagan E, Müller M, Hornberger M, y Vauzour D (2018) Impact of Flavonoids on Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Age-Related Cognitive Decline and Neurodegeneration. *Curr Nutr Rep* 7:49-57.
- Foucault-Fruchard L, y Antier D (2017) Therapeutic potential of α 7 nicotinic receptor agonists to regulate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 12:1418-1421.
- Fucile S (2017) The Distribution of Charged Amino Acid Residues and the Ca²⁺ Permeability of Nicotinic Acetylcholine Receptors: A Predictive Model. *Front Mol Neurosci* 10:1-10.
- Galzi JL, Bertrand S, Corringer P-J, Changeux J-P, y Bertrand D (1996) Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J* 15:5824-5832.
- Ganai AA, y Farooqi H (2015) Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother* 76:30-38.
- Gao F, Bren N, Burghardt TP, Hansen SB, Henschman RH, Taylor P, McCammon JA, y Sine SM (2005) Agonist-mediated Conformational Changes in Acetylcholine-binding Protein Revealed by Simulation and Intrinsic Tryptophan Fluorescence. *J Biol Chem* 280:8443-8451.
- Gee KW, Olincy A, Kanner R, Johnson L, Hogenkamp D, Harris J, Tran M, Edmonds SA, Sauer W, Yoshimura R, Johnstone T, y Freedman R (2017) First in human trial of a type I positive allosteric modulator of α 7-nicotinic acetylcholine receptors: Pharmacokinetics, safety, and evidence for neurocognitive effect of AVL-3288. *J Psychopharmacol* 31:434-441.
- Gergalova G, Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, Chernyshov V, Kryukova E, Tsetlin V, Komisarenko S, y Skok M (2012) Mitochondria Express α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors to Regulate Ca²⁺ Accumulation and Cytochrome c Release: Study on Isolated Mitochondria. *PLoS One* 7:e31361.
- Gergalova G, Lykhmus O, Komisarenko S, y Skok M (2014) α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Control Cytochrome c Release From Isolated Mitochondria Through Kinase-Mediated Pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 49:26-31.
- Gielen M, y Corringer P-J (2018) The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *J Physiol* 596:1873-1902.
- Gielen M, Thomas P, y Smart TG (2015) The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nat Commun* 6:1-10.
- Gildawie KR, Galli RL, Shukitt-Hale B, y Carey AN (2018) Protective Effects of Foods Containing Flavonoids on Age-Related Cognitive Decline. *Curr Nutr Rep* 7:39-48.
- Gill JK, Chatzidaki A, Ursu D, Sher E, y Millar NS (2013) Contrasting Properties of α 7-Selective Orthosteric and Allosteric Agonists Examined on Native Nicotinic Acetylcholine Receptors. *PLoS One* 8:e55047.
- Gill JK, Dhankher P, D'Oyley JM, Sheppard TD, y Millar NS (2015) Structurally Similar Allosteric Modulators of α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Exhibit Five Distinct Pharmacological Effects. *J Biol Chem* 290:3552-3562.
- Gill JK, Savolainen M, Young GT, Zwart R, Sher E, y Millar NS (2011) Agonist activation of α 7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci* 108:5867-5872.
- Glossmann H, Presek P, y Eigenbrodt E (1981) Quercetin inhibits tyrosine phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase, pp60src. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 317:100-102.
- Godoy JA, Lindsay CB, Quintanilla RA, Carvajal FJ, Cerpa W, y Inestrosa NC (2017) Quercetin Exerts Differential Neuroprotective Effects Against H₂O₂ and A β Aggregates in Hippocampal Neurons: the Role of Mitochondria. *Mol Neurobiol* 54:7116-7128.
- Gotti C, y Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74:363-396.
- Goutman JD, Waxenberg MD, Doñate-Oliver F, Pomata PE, y Calvo DJ (2003) Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA A and GABA C receptors. *Eur J Pharmacol* 461:79-87.
- Grando SA (2014) Connections of nicotine to cancer. *Nat Rev Cancer* 14:419-429.
- Grønlien JH, Håkerud M, Ween H, Thorin-Hagene K, Briggs CA, Gopalakrishnan M, y Malysz J (2007) Distinct profiles of α 7 nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol* 72:715-724.
- Grønlien JH, Ween H, Thorin-Hagene K, Cassar S, Li J, Briggs CA, Gopalakrishnan M, y Malysz J (2010) Importance of M2-M3 loop in governing properties of genistein at the α 7 nicotinic acetylcholine receptor inferred from α 7/5-HT_{3A} chimera. *Eur J Pharmacol* 647:37-47.
- Grosman C, Zhou M, y Auerbach A (2000) Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating. *Nature* 403:773-776.
- Grupe M, Grunnet M, Bastlund JF, y Jensen AA (2015) Targeting α 4 β 2 Nicotinic Acetylcholine Receptors in Central Nervous System Disorders: Perspectives on Positive Allosteric Modulation as a Therapeutic Approach. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 116:187-200.
- Grutter T, de Carvalho LP, Dufresne V, Taly A, Edelstein SJ, y

- Changeux J-P (2005) Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci* 102:18207-18212.
- Gu S, Matta JA, Lord B, Harrington AW, Sutton SW, Davini WB, y Bredt DS (2016) Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron* 89:948-955.
- Guan B, Chen X, y Zhang H (2013) Two-Electrode Voltage Clamp, en *Ion Channels. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* pp 79-89, Humana Press, Totowa, NJ.
- Guan YZ, Jin XD, Guan LX, Yan HC, Wang P, Gong Z, Li SJ, Cao X, Xing YL, y Gao TM (2015) Nicotine Inhibits Microglial Proliferation and Is Neuroprotective in Global Ischemia Rats. *Mol Neurobiol* 51:1480-1488.
- Guerra-Álvarez M, Moreno-Ortega AJ, Navarro E, Fernández-Morales JC, Egea J, López MG, y Cano-Abad MF (2015) Positive allosteric modulation of alpha-7 nicotinic receptors promotes cell death by inducing Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *J Neurochem* 133:309-319.
- Gupta S, y Auerbach A (2011) Temperature dependence of acetylcholine receptor channels activated by different agonists. *Biophys J* 100:895-903.
- Haam J, y Yakel JL (2017) Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J Neurochem* 142:111-121.
- Hajos M, Hurst RS, Hoffmann WE, Krause M, Wall TM, Higdon NR, y Groppi VE (2004) The Selective $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist PNU-282987 [N-[(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-4-chlorobenzamide Hydrochloride] Enhances GABAergic Synaptic Activity in Brain Slices and Restores Auditory Gating Deficits in Anesthetized Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 312:1213-1222.
- Hales TG, Dunlop JJ, Deeb TZ, Carland JE, Kelley SP, Lambert JJ, y Peters JA (2006) Common determinants of single channel conductance within the large cytoplasmic loop of 5-hydroxytryptamine type 3 and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 281:8062-8071.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, y Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85-100.
- Hanrahan JR, Chebib M, y Johnston GAR (2011) Flavonoid modulation of GABA A receptors. *Br J Pharmacol* 163:234-245.
- Hansen SB, Wang HL, Taylor P, y Sine SM (2008) An ion selectivity filter in the extracellular domain of Cys-loop receptors reveals determinants for ion conductance. *J Biol Chem* 283:36066-36070.
- Hassaine G, Deluz C, Grasso L, Wyss R, Tol MB, Hovius R, Graff A, Stahlberg H, Tomizaki T, Desmyter A, Moreau C, Li X-D, Poitevin F, Vogel H, y Nury H (2014) X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* 512:276-281.
- Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16:710-715.
- Hilf RJC, y Dutzler R (2009) Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 457:115-118.
- Hilf RJC, y Dutzler R (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452:375-379.
- Hill A V (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* XL:4-7.
- Horenstein NA, Papke RL, Kulkarni AR, Chaturbhuj GU, Stokes C, Manther K, y Thakur GA (2016) Critical Molecular Determinants of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Allosteric Activation: Separation of direct allosteric activation and positive allosteric modulation. *J Biol Chem* 291:5049-5067.
- Horsman GP, y Zechel DL (2017) Phosphonate Biochemistry. *Chem Rev* 117:5704-5783.
- Hu M, Gopalakrishnan M, y Li J (2009) Positive allosteric modulation of $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Lack of cytotoxicity in PC12 cells and rat primary cortical neurons. *Br J Pharmacol* 158:1857-1864.
- Hu XQ, Sun H, Peoples RW, Hong R, y Zhang L (2006) An interaction involving an arginine residue in the cytoplasmic domain of the 5-HT_{3A} receptor contributes to receptor desensitization mechanism. *J Biol Chem* 281:21781-21788.
- Huang RQ, y Dillon GH (2000) Direct inhibition of glycine receptors by genistein, a tyrosine kinase inhibitor. *Neuropharmacology* 39:2195-2204.
- Huang RQ, Fang MJ, y Dillon GH (1999) The tyrosine kinase inhibitor genistein directly inhibits GABA(A) receptors. *Mol Brain Res* 67:177-183.
- Huang X, Chen H, y Shaffer PL (2017) Crystal Structures of Human GlyR $\alpha 3$ Bound to Ivermectin. *Structure* 25:945-950.
- Huang X, Shaffer PL, Ayube S, Bregman H, Chen H, Lehto SG, Luther JA, Matson DJ, McDonough SI, Michelsen K, Plant MH, Schneider S, Simard JR, Teffera Y, Yi S, Zhang M, Dimairo EF, y Gingras J (2017) Crystal structures of human glycine receptor $\alpha 3$ bound to a novel class of analgesic potentiators. *Nat Struct Mol Biol* 24:108-113.
- Hurst RS, Hajos M, Raggenbass M, Wall TM, Higdon NR, Lawson JA, Rutherford-Root KL, Berkenpas MB, Hoffmann WE, Piotrowski DW, Groppi VE, Allaman G, Ogier R, Bertrand S, Bertrand D, y Arneric SP (2005) A Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor: In Vitro and In Vivo Characterization. *J Neurosci* 25:4396-4405.
- Hurst RS, Rollema H, y Bertrand D (2013) Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther* 137:22-54.
- Jaeger BN, Parylak SL, y Gage FH (2018) Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation. *Mol Aspects Med* 61:50-62.
- Jain A, Kuryatov A, Wang J, Kamenecka TM, y Lindstrom J (2016) Unorthodox acetylcholine binding sites formed by $\alpha 5$ and $\beta 3$ accessory subunits in $\alpha 4\alpha 2*$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 291:23452-23463.
- Jeanmaire T, Hervaud Y, y Boutevin B (2002) Synthesis of dialkyl-hydroxymethylphosphonates in heterogeneous conditions. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem* 177:1137-1145.
- Jha A, Cadugan DJ, Purohit P, y Auerbach A (2007) Acetylcholine Receptor Gating at Extracellular Transmembrane Domain Interface: the Cys-Loop and M2-M3 Linker. *J Gen Physiol* 130:547-558.
- Jindrichova M, Lansdell SJ, y Millar NS (2012) Changes in temperature have opposing effects on current amplitude in $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *PLoS One* 7:e32073.

- Johnston GAR (2015) Flavonoid nutraceuticals and ionotropic receptors for the inhibitory neurotransmitter GABA. *Neurochem Int* 89:120-125.
- Kabbani N, y Nichols RA (2018) Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 39:354-366.
- Kabbani N, Nordman JC, Corgiat BA, Veltri DP, Shehu A, Seymour VA, y Adams DJ (2013) Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *BioEssays* 35:1025-1034.
- Kalashnyk OM, Gergalova GL, Komisarenko SV, y Skok MV (2012) Intracellular localization of nicotinic acetylcholine receptors in human cell lines. *Life Sci* 91:1033-1037.
- Kalt W, Blumberg JB, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SAE, Graf BA, O'Leary JM, y Milbury PE (2008) Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs. *J Agric Food Chem* 56:705-712.
- Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR, y Harrison NL (2003) Coupling of agonist binding to channel gating in the GABAA receptor. *Nature* 421:272-275.
- Kawai Y (2018) Understanding metabolic conversions and molecular actions of flavonoids in vivo: toward new strategies for effective utilization of natural polyphenols in human health. *J Med Investig* 65:162-165.
- Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, y Peters JA (2003) A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* 424:321-324.
- Kharb R, Sharma PC, y Yar MS (2011) Pharmacological significance of triazole scaffold. *J Enzyme Inhib Med Chem* 26:1-21.
- Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, y Yakel JL (2002) Rat nicotinic ACh receptor $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 540:425-434.
- Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, y Akaike A (2001) $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Transduces Signals to Phosphatidylinositol 3-Kinase to Block A β -Amyloid-induced Neurotoxicity. *J Biol Chem* 276:13541-13546.
- Kim H-J, Lee B-H, Choi S-H, Jung S-W, Kim H-S, Hwang S-H, Pyo MK, Kim H-C, y Nah S-Y (2015) Differential effects of quercetin glycosides on GABA C receptor channel activity. *Arch Pharm Res* 38:108-114.
- King JR, Nordman JC, Bridges SP, Lin M-KK, y Kabbani N (2015) Identification and characterization of a G protein-binding cluster in $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 290:20060-20070.
- Koopman WJH, Verkaart S, van Emst-de Vries SE, Grefte S, Smeitink JAM, y Willems PHGM (2006) Simultaneous quantification of oxidative stress and cell spreading using 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorofluorescein. *Cytom Part A* 69A:1184-1192.
- Koshland DE, Nemethy JG, y Filmer D (1966) Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry* 5:365-385.
- Kowal NM, Ahring PK, Liao VWY, Indurti DC, Harvey BS, O'Connor SM, Chebib M, Olafsdottir ES, y Balle T (2018) Galantamine is not a positive allosteric modulator of human $\alpha 4\beta 2$ or $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Br J Pharmacol* 175:2911-2925.
- Kracun S, Harkness PC, Gibb AJ, y Millar NS (2008) Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function. *Br J Pharmacol* 153:1474-1484.
- Krasieva TB, Ehren J, O'Sullivan T, Tromberg BJ, y Maher P (2015) Cell and brain tissue imaging of the flavonoid fisetin using label-free two-photon microscopy. *Neurochem Int* 89:243-248.
- Krause RM, Buisson B, Bertrand S, Corringer P-J, Galzi JL, Changeux J-P, y Bertrand D (1998) Ivermectin: A Positive Allosteric Effector of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Mol Pharmacol* 53:283-294.
- Kujawska M, y Jodynis-Liebert J (2018) Polyphenols in Parkinson's Disease: A Systematic Review of In Vivo Studies. *Nutrients* 10:1-34.
- Kuo YP (2005) Roles for Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Large Cytoplasmic Loop Sequences in Receptor Expression and Function. *J Pharmacol Exp Ther* 314:455-466.
- Kusano A, Nikaido T, Kuge T, Ohmoto T, Monache GD, Botta B, Botta M, y Saitoh T (1991) Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids from licorice roots and 4-arylcoumarins. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39:930-933.
- Lansdell SJ, Collins T, Goodchild J, y Millar NS (2012) The Drosophila nicotinic acetylcholine receptor subunits D $\alpha 5$ and D $\alpha 7$ form functional homomeric and heteromeric ion channels. *BMC Neurosci* 13:1-11.
- Lape R, Colquhoun D, y Sivilotti LG (2008) On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature* 454:722-727.
- Lasala M, Corradi J, Bruzzone A, Esandi M del C, y Bouzat C (2018) A human-specific, truncated $\alpha 7$ nicotinic receptor subunit assembles with full-length $\alpha 7$ and forms functional receptors with different stoichiometries. *J Biol Chem* 293:10707-10717.
- Laverty D, Thomas P, Field M, Andersen OJ, Gold MG, Biggin PC, Gielen M, y Smart TG (2017) Crystal structures of a GABA A-receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites. *Nat Struct Mol Biol* 24:977-985.
- Law RJ, Henchman RH, y McCammon JA (2005) A gating mechanism proposed from a simulation of a human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci* 102:6813-6818.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, y Bondy SC (1992) Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231.
- Lee B-H, Choi S-H, Kim H-J, Jung S-W, Hwang S-H, Pyo MK, Rhim H, Kim H-C, Kim H-K, Lee S-M, y Nah S-Y (2016) Differential effects of quercetin and quercetin glycosides on human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated ion currents. *Biomol Ther* 24:410-417.
- Lee B-H, Choi S-H, Shin T-J, Pyo MK, Hwang S-H, Kim B-R, Lee S-M, Lee J-H, Kim H-C, Park H-Y, Rhim H, y Nah S-Y (2010) Quercetin enhances human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated ion current through interactions with Ca²⁺ binding sites. *Mol Cells* 30:245-253.
- Lee B-H, Choi S-H, Shin T-J, Pyo MK, Hwang S-H, Lee S-M, Paik H-D, Kim H-C, y Nah S-Y (2011) Effects of quercetin on $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated ion currents. *Eur J Pharmacol* 650:79-85.

- Lee B-H, Hwang S-H, Choi S-H, Shin T-J, Kang J, Lee S-M, y Nah S-Y (2011) Quercetin inhibits $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated ion currents expressed in *Xenopus* oocytes. *Korean J Physiol Pharmacol* 15:17-22.
- Lee B-H, Jeong S-M, Jung S-M, Lee Jun-Ho, Kim J-H, Yoon I-S, Lee Joon-Hee, Choi S-H, Lee S-M, Chang C-G, Kim H-C, Han Y, Paik H-D, Kim Y, y Nah S-Y (2005) Quercetin inhibits the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor-mediated ion current by interacting with pre-transmembrane domain I. *Mol Cells* 20:69-73.
- Lee B-H, Lee Jun-Ho, Yoon I-S, Lee Joon-Hee, Choi S-H, Pyo MK, Jeong SM, Choi WS, Shin T-J, Lee S-M, Rhim H, Park YS, Han YS, Paik H-D, Cho S-G, Kim CH, Lim YH, y Nah S-Y (2007) Human glycine $\alpha 1$ receptor inhibition by quercetin is abolished or inverted by $\alpha 267$ mutations in transmembrane domain 2. *Brain Res* 1161:1-10.
- Lee B-H, Pyo MK, Lee J-H, Choi S-H, Shin T-J, Lee S-M, Lim YH, Han YS, Paik H-D, Cho S-G, Yun-Choi HS, Rhim H, y Nah S-Y (2008) Differential Regulations of Quercetin and Its Glycosides on Ligand-Gated Ion Channels. *Biol Pharm Bull* 31:611-617.
- Lee B-H, Shin T, Hwang S, Choi S, Kang J, Kim H, Park C, Lee S, y Nah S (2011) Inhibitory Effects of Quercetin on Muscletype of Nicotinic Acetylcholine Receptor-Mediated Ion Currents Expressed in *Xenopus* Oocytes. *Korean J Physiol Pharmacol* 15:195-201.
- Lee WY, Free CR, y Sine SM (2009) Binding to Gating Transduction in Nicotinic Receptors: Cys-Loop Energetically Couples to Pre-M1 and M2-M3 Regions. *J Neurosci* 29:3189-3199.
- Lee WY, y Sine SM (2005) Principal pathway coupling agonist binding to channel gating in nicotinic receptors. *Nature* 438:243-247.
- Lendvai B, Kassai F, Szájlí Á, y Némethy Z (2013) $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Res Bull* 93:86-96.
- Lendvai B, y Vizi ES (2008) Nonsynaptic Chemical Transmission Through Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Physiol Rev* 88:333-349.
- Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF, y Barberger-Gateau P (2007) Flavonoid Intake and Cognitive Decline over a 10-Year Period. *Am J Epidemiol* 165:1364-1371.
- Lipovsek M, Im GJ, Franchini LF, Pisciotto F, Katz E, Fuchs PA, y Elgoyhen AB (2012) Phylogenetic differences in calcium permeability of the auditory hair cell cholinergic nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci* 109:4308-4313.
- Liu Q, Huang Y, Shen J, Steffensen S, y Wu J (2012) Functional $\alpha 7\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors expressed in hippocampal interneurons exhibit high sensitivity to pathological level of amyloid β peptides. *BMC Neurosci* 13:155-166.
- Liu Q, Huang Y, Xue F, Simard A, DeChon J, Li G, Zhang J, Lucero L, Wang M, Sierks M, Hu G, Chang Y, Lukas RJ, y Wu J (2009) A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci* 29:918-929.
- Liu Q, Kuo YP, Shen J, Lukas RJ, y Wu J (2015) Roles of nicotinic acetylcholine receptor β subunit cytoplasmic loops in acute desensitization and single-channel features. *Neuroscience* 289:315-323.
- Liu Q, Xie X, Emadi S, Sierks M, y Wu J (2015) A novel nicotinic mechanism underlies β -amyloid-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology* 97:457-463.
- Liu Q, Xie X, Lukas RJ, St John PA, y Wu J (2013) A novel nicotinic mechanism underlies β -amyloid-induced neuronal hyperexcitation. *J Neurosci* 33:7253-7263.
- Ludwig J, Höffle A, Samochocki M, Luttmann E, Albuquerque EX, Fels G, y Maelicke A (2010) Localization by site-directed mutagenesis of a galantamine binding site on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor extracellular domain. *J Recept Signal Transduct* 30:469-483.
- Lykhmus O, Gergalova G, Koval L, Zhmak M, Komisarenko S, y Skok M (2014) Mitochondria express several nicotinic acetylcholine receptor subtypes to control various pathways of apoptosis induction. *Int J Biochem Cell Biol* 53:246-252.
- Lynagh T, y Lynch JW (2012) Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci* 33:432-441.
- Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, Fehrenbacher A, Ludwig J, Albuquerque EX, y Zerlin M (2001) Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 49:279-288.
- Maelicke A, Schrattenholz A, Samochocki M, Radina M, y Albuquerque EX (2000) Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 113:199-206.
- Malysz J, Grønlien JH, Anderson DJ, Håkerud M, Thorin-Hagene K, Ween H, Wetterstrand C, Briggs CA, Faghieh R, Bunnelle WH, y Gopalakrishnan M (2009) In vitro pharmacological characterization of a novel allosteric modulator of $\alpha 7$ neuronal acetylcholine receptor, 4-(5-(4-chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1H-pyrrol-1-yl)benzenesulfonamide (A-867744), exhibiting unique pharmacological profile. *J Pharmacol Exp Ther* 330:257-267.
- Manetti D, Bellucci C, Chiaramonte N, Dei S, Teodori E, y Romanelli MN (2018) Designing selective modulators for the nicotinic receptor subtypes: challenges and opportunities. *Future Med Chem* 10:433-459.
- Martin BP, Vasilieva E, Dupureur CM, y Spilling CD (2015) Synthesis and comparison of the biological activity of monocyclic phosphonate, difluorophosphonate and phosphate analogs of the natural AChE inhibitor cyclophostin. *Bioorganic Med Chem* 23:7529-7534.
- Massarotti A, Aprile S, Mercalli V, Del Grosso E, Grosa G, Sorba G, y Tron GC (2014) Are 1,4- and 1,5-disubstituted 1,2,3-triazoles good pharmacophoric groups? *ChemMedChem* 9:2497-2508.
- Mazzaferro S, Benallegue N, Carbone AL, Gasparri F, Vijayan R, Biggin PC, Moroni M, y Bermudez I (2011) Additional Acetylcholine (ACh) binding site at $\alpha 4/\alpha 4$ interface of $(\alpha 4\beta 2)\alpha 4$ nicotinic receptor influences agonist sensitivity. *J Biol Chem* 286:31043-31054.
- Mazzaferro S, Bermudez I, y Sine SM (2017) $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors: Relationships between subunit stoichiometry and function at the single channel level. *J Biol Chem* 292:2729-2740.
- Mazzaferro S, Gasparri F, New K, Alcaino C, Faundez M, Vasquez PI, Vijayan R, Biggin PC, y Bermudez I (2014) Non-equivalent ligand selectivity of agonist sites in $(\alpha 4\beta 2)\alpha 4$ nicotinic acetylcholine receptors: A key determinant of agonist efficacy. *J Biol Chem* 289:21795-21806.
- McCormack TJ, Melis C, Colón J, Gay EA, Mike A, Karoly R, Lamb PW, Molteni C, y Yakel JL (2010) Rapid desensitization of the rat $\alpha 7$ nAChR is facilitated by the presence of a proline

- residue in the outer β -sheet. *J Physiol* 588:4415-4429.
- McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, y Role LW (1995) Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 269:1692-1696.
- Metcalfe WW, y van der Donk WA (2009) Biosynthesis of Phosphonic and Phosphinic Acid Natural Products. *Annu Rev Biochem* 78:65-94.
- Mike A, Castro NG, y Albuquerque EX (2000) Choline and acetylcholine have similar kinetic properties of activation and desensitization on the $\alpha 7$ nicotinic receptors in rat hippocampal neurons. *Brain Res* 882:155-168.
- Milbury PE, y Kalt W (2010) Xenobiotic Metabolism and Berry Flavonoid Transport across the Blood-Brain Barrier. *J Agric Food Chem* 58:3950-3956.
- Millar NS, y Gotti C (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56:237-246.
- Miller PS, y Aricescu AR (2014) Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature* 512:270-275.
- Miller PS, Scott S, Masiulis S, De Colibus L, Pardon E, Steyaert J, y Aricescu AR (2017) Structural basis for GABA A receptor potentiation by neurosteroids. *Nat Struct Mol Biol* 24:986-992.
- Miller RJ (1998) Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:201-227.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, y Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423:949-955.
- Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, Llorach R, Garrido I, Gómez-Cordovés C, Andres-Lacueva C, y Bartolomé B (2010) Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct* 1:233-253.
- Monod J, Wyman J, y Changeux J-P (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J Mol Biol* 12:88-118.
- Morales-Perez CL, Noviello CM, y Hibbs RE (2016) X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature* 538:411-415.
- Moretti M, Zoli M, George AA, Lukas RJ, Pistillo F, Maskos U, Whiteaker P, y Gotti C (2014) The novel $\alpha 7\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization. *Mol Pharmacol* 86:306-317.
- Moroni M, Vijayan R, Carbone AL, Zwart R, Biggin PC, y Bermudez I (2008) Non-Agonist-Binding Subunit Interfaces Confer Distinct Functional Signatures to the Alternate Stoichiometries of the $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptor: An $\alpha 4$ - $\alpha 4$ Interface Is Required for Zn²⁺ Potentiation. *J Neurosci* 28:6884-6894.
- Mowrey DD, Liu Q, Bondarenko V, Chen Q, Seyoum E, Xu Y, Wu J, y Tang P (2013) Insights into distinct modulation of $\alpha 7$ and $\alpha 7\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the volatile anesthetic. *J Biol Chem* 288:35793-35800.
- Mukhtasimova N, Lee WY, Wang HL, y Sine SM (2009) Detection and trapping of intermediate states priming nicotinic receptor channel opening. *Nature* 459:451-454.
- Murray TA, Bertrand D, Papke RL, George AA, Pantoja R, Srinivasan R, Liu Q, Wu J, Whiteaker P, Lester HA, y Lukas RJ (2012) $\alpha 7\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Assemble, Function, and Are Activated Primarily Via Their $\alpha 7$ - $\alpha 7$ Interfaces. *Mol Pharmacol* 81:175-188.
- Navarro E, Buendia I, Parada E, León R, Jansen-Duerr P, Pircher H, Egea J, y Lopez MG (2015) Alpha7 nicotinic receptor activation protects against oxidative stress via heme-oxygenase I induction. *Biochem Pharmacol* 97:473-481.
- Navarro E, Gonzalez-Lafuente L, Pérez-Liébana I, Buendia I, López-Bernardo E, Sánchez-Ramos C, Prieto I, Cuadrado A, Satrustegui J, Cadenas S, Monsalve M, y López MG (2016) Heme-Oxygenase I and PCG-1 α Regulate Mitochondrial Biogenesis via Microglial Activation of Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Using PNU282987. *Antioxid Redox Signal* 27:93-105.
- Neher E, y Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, y Lindstrom J (2003) Alternate Stoichiometries of alpha4beta2 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol* 63:332-341.
- Nemecz Á, Prevost MS, Menny A, y Corringer P-J (2016) Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* 90:452-470.
- Newcombe J, Chatzidaki A, Sheppard TD, Topf M, y Millar NS (2018) Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptor Positive Allosteric Modulators Revealed by Mutagenesis and a Revised Structural Model. *Mol Pharmacol* 93:128-140.
- Newman EL, Gupta K, Climer JR, Monaghan CK, y Hasselmo ME (2012) Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Front Behav Neurosci* 6:1-19.
- Ng HJ, Hogenkamp D, Stevens KE, Gee KW, Zheng L, Tran M, Johnstone T, Broide RS, y Whittemore ER (2007) Nootropic $\alpha 7$ nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci* 104:8059-8064.
- Nordman JC, y Kabbani N (2012) An interaction between $\alpha 7$ nicotinic receptors and a G-protein pathway complex regulates neurite growth in neural cells. *J Cell Sci* 125:5502-5513.
- Nurk E, Refsum H, Drevon CA, Tell GS, Nygaard HA, Engedal K, y Smith AD (2009) Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. *J Nutr* 139:120-127.
- Okonjo KO, Kuhlmann J, y Maelicke A (1991) A second pathway of activation of the Torpedo acetylcholine receptor channel. *Eur J Biochem* 200:671-677.
- Paas Y, Gibor G, Grailhe R, Savatier-Duclert N, Dufresne V, Sunesen M, de Carvalho LP, Changeux J-P, y Attali B (2005) Pore conformations and gating mechanism of a Cys-loop receptor. *Proc Natl Acad Sci* 102:15877-15882.
- Pałczyńska MM, Jindrichova M, Gibb AJ, y Millar NS (2012) Activation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors by Orthosteric and Allosteric Agonists: Influence on Single-Channel Kinetics and Conductance. *Mol Pharmacol* 82:910-917.
- Palma E, Maggi L, Barabino B, Eusebi F, y Ballivet M (1999) Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the $\alpha 7$ and $\beta 3$ subunits. *J Biol Chem* 274:18335-18340.
- Panche AN, Diwan AD, y Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 5:1-15.

- Papke RL (2014) Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 89:1-11.
- Papke RL, Horenstein NA, Kulkarni AR, Stokes C, Corrie LW, Maeng CY, y Thakur G a. (2014) The Activity of GAT107, an Allosteric Activator and Positive Modulator of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors (nAChR), Is Regulated by Aromatic Amino Acids That Span the Subunit Interface. *J Biol Chem* 289:4515-4531.
- Papke RL, Meyer EM, Nutter T, y Uteshev V V. (2000) $\alpha 7$ Receptor-selective agonists and modes of $\alpha 7$ receptor activation. *Eur J Pharmacol* 393:179-195.
- Papke RL, y Porter Papke JK (2002) Comparative pharmacology of rat and human $\alpha 7$ nAChR conducted with net charge analysis. *Br J Pharmacol* 137:49-61.
- Parada E, Egea J, Buendia I, Negredo P, Cunha AC, Cardoso S, Soares MP, y López MG (2013) The Microglial $\alpha 7$ -Acetylcholine Nicotinic Receptor Is a Key Element in Promoting Neuroprotection by Inducing Heme Oxygenase-1 via Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2. *Antioxid Redox Signal* 19:1135-1148.
- Parada E, Egea J, Romero A, del Barrio L, García AG, y López MG (2010) Poststress treatment with PNU282987 can rescue SH-SY5Y cells undergoing apoptosis via $\alpha 7$ nicotinic receptors linked to a Jak2/Akt/HO-1 signaling pathway. *Free Radic Biol Med* 49:1815-1821.
- Park HJ, Lee PH, Ahn YW, Choi YJ, Lee G, Lee DY, Chung ES, y Jin BK (2007) Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action. *Eur J Neurosci* 26:79-89.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML, y Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci* 90:8392-8396.
- Pesti K, Szabo AK, Mike A, y Vizi ES (2014) Kinetic properties and open probability of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 81:101-115.
- Peters JA, Cooper MA, Carland JE, Livesey MR, Hales TG, y Lambert JJ (2010) Novel structural determinants of single channel conductance and ion selectivity in 5-hydroxytryptamine type 3 and nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol* 588:587-596.
- Petkowski J, Bains W, y Seager S (2019) Natural Products Containing 'Rare' Organophosphorus Functional Groups. *Molecules* 24:1-66.
- Picciotto MR, Higley MJ, y Mineur YS (2012) Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* 76:116-129.
- Picciotto MR, Zoli M, Léna C, Bessis A, Lallemand Y, Le Novère N, Vincent P, Pich EM, Brûlet P, y Changeux J-P (1995) Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* 374:65-67.
- Placzek AN, Grassi F, Papke T, Meyer EM, y Papke RL (2004) A single point mutation confers properties of the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor to homomeric $\alpha 7$ receptors. *Mol Pharmacol* 66:169-77.
- Purohit P, y Auerbach A (2007) Acetylcholine Receptor Gating at Extracellular Transmembrane Domain Interface: the "Pre-M1" Linker. *J Gen Physiol* 130:559-568.
- Purohit P, Mitra A, y Auerbach A (2007) A stepwise mechanism for acetylcholine receptor channel gating. *Nature* 446:930-933.
- Puskar NL, Xiu X, Lester HA, y Dougherty DA (2011) Two neuronal nicotinic acetylcholine receptors, $\alpha 4\beta 4$ and $\alpha 7$, show differential agonist binding modes. *J Biol Chem* 286:14618-14627.
- Qian Y, Cao L, Guan T, Chen L, Xin H, Li Y, Zheng R, y Yu D (2015) Protection by genistein on cortical neurons against oxidative stress injury via inhibition of NF- κ B, JNK and ERK signaling pathway. *Pharm Biol* 53:1124-1132.
- Quick MW, y Lester RAJ (2002) Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53:457-478.
- Rauter AP, Ennis M, Hellwich K-H, Herold BJ, Horton D, Moss GP, y Schomburg I (2018) Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). *Pure Appl Chem* 90:1429-1486.
- Rayes D, De Rosa MJ, Sine SM, y Bouzat C (2009) Number and Locations of Agonist Binding Sites Required to Activate Homomeric Cys-Loop Receptors. *J Neurosci* 29:6022-6032.
- Rayes D, Spitzmaul G, Sine SM, y Bouzat C (2005) Single-channel kinetic analysis of chimeric $\alpha 7$ -5HT3A receptors. *Mol Pharmacol* 68:1475-1483.
- Ren C, Tong YL, Li JC, Lu ZQ, y Yao YM (2017) The protective effect of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation on critical illness and its mechanism. *Int J Biol Sci* 13:46-56.
- Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Mulle C, Hussy N, Bertrand S, Ballivet M, y Changeux J-P (1991) Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* 353:846-849.
- Robinson L, Platt B, y Riedel G (2011) Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav Brain Res* 221:443-465.
- Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo CR, y Rotilio G (2008) Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 33:2390-2400.
- Sahdeo S, Wallace TL, Hirakawa R, Knoflach F, Bertrand D, Maag H, Misner D, Tombaugh GC, Santarelli L, Brameld K, Milla ME, y Button DC (2014) Characterization of RO5126946, a Novel $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor-Positive Allosteric Modulator. *J Pharmacol Exp Ther* 350:455-468.
- Sahu JK, Ganguly S, y Kaushik A (2013) Triazoles: A valuable insight into recent developments and biological activities. *Chin J Nat Med* 11:456-465.
- Samochocki M, Höffle A, Fehrenbacher A, Jostock R, Ludwig J, Christner C, Radina M, Zerlin M, Ullmer C, Pereira EFR, Lübbert H, Albuquerque EX, y Maelicke A (2003) Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 305:1024-1036.
- Sauguet L, Shahsavari A, Poitevin F, Huon C, Menny A, Nemeček Á, Haouz A, Changeux J-P, Corringer P-J, y Delarue M (2014) Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci* 111:966-971.
- Schaffer S, y Halliwell B (2012) Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes Nutr* 7:99-109.
- Schlicker E, y Feuerstein T (2017) Human presynaptic receptors. *Pharmacol Ther* 172:1-21.
- Schrattenholz A, Pereira EFR, Roth U, Weber KH, Albuquerque EX, y Maelicke A (1996) Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Mol Pharmacol*

- 49:1-6.
- Schuller HM (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* 9:195-205.
- Sebastian RS, Wilkinson Enns C, Goldman JD, Martin CL, Steinfeldt LC, Murayi T, y Moshfegh AJ (2015) A New Database Facilitates Characterization of Flavonoid Intake, Sources, and Positive Associations with Diet Quality among US Adults. *J Nutr* 145:1239-1248.
- Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, y Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596-604.
- Sepúlveda M, Gonano LA, Back TG, Chen SRW, y Vila Petroff M (2013) Role of CaMKII and ROS in rapid pacing-induced apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 63:135-145.
- Sgard F, Charpantier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D, y Besnard F (2002) A novel human nicotinic receptor subunit, $\alpha 10$, that confers functionality to the $\alpha 9$ subunit. *Mol Pharmacol* 61:150-159.
- Sharma G, y Vijayaraghavan S (2002) Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J Neurobiol* 53:524-534.
- Shaw S, Bencherif M, y Marrero MB (2002) Janus kinase 2, an early target of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against $A\beta$ (1-42) amyloid. *J Biol Chem* 277:44920-44924.
- Shen J, y Yakel JL (2012) Functional $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors on astrocytes in rat hippocampal CA1 slices. *J Mol Neurosci* 48:14-21.
- Shi S, Liang D, Bao M, Xie Y, Xu W, Wang L, Wang Z, y Qiao Z (2016) Gx-50 Inhibits Neuroinflammation via $\alpha 7$ nAChR Activation of the JAK2/STAT3 and PI3K/AKT Pathways. *J Alzheimer's Dis* 50:859-871.
- Shin T-J, Choi S-H, Lee B-H, Pyo MK, Hwang S-H, Kim B-R, Lee S-M, Han YS, Lee J-H, Park J-H, Kim H-C, Rhim H, y Nah S-Y (2010) Effects of Quercetin on Human α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor-Mediated Ion Currents. *Biol Pharm Bull* 33:1615-1619.
- Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, y Tan J (2004) Cholinergic modulation of microglial activation by $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J Neurochem* 89:337-343.
- Sine SM (2002) The nicotinic receptor ligand binding domain. *J Neurobiol* 53:431-446.
- Sine SM, y Engel AG (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440:448-455.
- Sitzia F, Brown JT, Randall AD, y Dunlop J (2011) Voltage- and Temperature-Dependent Allosteric Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors by PNU120596. *Front Pharmacol* 2:1-9.
- Sivilotti LG, y Colquhoun D (2016) In praise of single channel kinetics. *J Gen Physiol* 148:79-88.
- Spencer JPE, Vafeiadou K, Williams RJ, y Vauzour D (2012) Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 33:83-97.
- Spencer JPE, Vauzour D, y Rendeiro C (2009) Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Arch Biochem Biophys* 492:1-9.
- Spurny R, Debaveye S, Farinha A, Veys K, Vos AM, Gossas T, Atack J, Bertrand S, Bertrand D, Danielson UH, Tresadern G, y Ulens C (2015) Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci* 112:E2543-E2552.
- Stauderman KA, Mahaffy LS, Akong M, Veliçelebi G, Chavez-Noriega LE, Crona JH, Johnson EC, Elliott KJ, Gillespie A, Reid RT, Adams P, Harpold MM, y Corey-Naeve J (1998) Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 4$ stably expressed in HEK293 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 284:777-789.
- Stuckenholtz V, Bacher M, Balzer-Geldsetzer M, Alvarez-Fischer D, Oertel WH, Dodel RC, y Noelker C (2013) The $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice. *J Parkinsons Dis* 3:161-172.
- Szabo AK, Pesti K, Mike A, y Vizi ES (2014) Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 81:42-54.
- Taly A, Corringer P-J, Guedin D, Lestage P, y Changeux J-P (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8:733-750.
- Taly A, Delarue M, Grutter T, Nilges M, Le Novère N, Corringer P-J, y Changeux J-P (2005) Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism. *Biophys J* 88:3954-3965.
- Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, y Lester HA (2004) Nicotine activation of $\alpha 4^*$ receptors: Sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* 306:1029-1032.
- Targowska-Duda KM, Kaczor AA, Jozwiak K, y Arias HR (2018) Molecular interactions of type I and type II positive allosteric modulators with the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor: an in silico study. *J Biomol Struct Dyn* 1102:1-29.
- Thomas P, y Smart TG (2005) HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51:187-200.
- Thompson AJ, Lester HA, y Lummis SCR (2010) The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q Rev Biophys* 43:449-499.
- Thomsen MS, Hansen HH, Timmermann DB, y Mikkelsen JD (2010) Cognitive improvement by activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: from animal models to human pathophysiology. *Curr Pharm Des* 16:323-343.
- Thomsen MS, Zwart R, Ursu D, Jensen MM, Pinborg LH, Gilmour G, Wu J, Sher E, y Mikkelsen JD (2015) $\alpha 7$ and $\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits Form Heteromeric Receptor Complexes that Are Expressed in the Human Cortex and Display Distinct Pharmacological Properties. *PLoS One* 10:e0130572.
- Tillman TS, Seyoum E, Mowrey DD, Xu Y, y Tang P (2014) ELIC- $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor ($\alpha 7$ nAChR) Chimeras Reveal a Prominent Role of the Extracellular-Transmembrane Domain Interface in Allosteric Modulation. *J Biol Chem* 289:13851-13857.
- Timmermann DB, Grønlien JH, Kohlhaas KL, Nielsen EO, Dam E, Jorgensen TD, Ahring PK, Peters D, Holst D, Christensen JK, Malysz J, Briggs CA, Gopalakrishnan M, y Olsen GM (2007) An Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Possessing Cognition-Enhancing

- Properties in Vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 323:294-307.
- Tsetlin V, Kuzmin D, y Kasheverov I (2011) Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *J Neurochem* 116:734-741.
- Tsoyi K, Chung H-T, Pae H, Kim HJ, Jang HJ, Kim JW, Chang HK, Chang KC, Lee JH, Seo HG, y Lee YS (2011) Stimulation of Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor by Nicotine Attenuates Inflammatory Response in Macrophages and Improves Survival in Experimental Model of Sepsis Through Heme Oxygenase-1 Induction. *Antioxid Redox Signal* 14:2057-2070.
- Ulubelen A, Kerr RR, y Mabry TJ (1982) Two new neoflavonoids and C-glycosylflavones from *Passiflora serratedigitata*. *Phytochemistry* 21:1145-1147.
- Unno K, Pervin M, Nakagawa A, Iguchi K, Hara A, Takagaki A, Nanjo F, Minami A, y Nakamura Y (2017) Blood-Brain Barrier Permeability of Green Tea Catechin Metabolites and their Neurotogenic Activity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Mol Nutr Food Res* 61:1-18.
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J Mol Biol* 346:967-989.
- Uteshev V (2016) Are positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nAChRs clinically safe? *J Neurochem* 136:217-219.
- Uteshev V (2014) The therapeutic promise of positive allosteric modulation of nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol* 727:181-185.
- Valor LM, Mulet J, Sala F, Sala S, Ballesta JJ, y Criado M (2002) Role of the large cytoplasmic loop of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit in receptor expression and function. *Biochemistry* 41:7931-7938.
- Vauzour D (2012) Dietary Polyphenols as Modulators of Brain Functions: Biological Actions and Molecular Mechanisms Underpinning Their Beneficial Effects. *Oxid Med Cell Longev* 2012:1-16.
- Vauzour D, Martinsen A, y Layé S (2015) Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects? *Neurochem Int* 89:63-74.
- Veselinović JB, Veselinović AM, Ilic-Tomic T, Davis R, O'Connor K, Pavic A, y Nikodinovic-Runic J (2017) Potent anti-melanogenic activity and favorable toxicity profile of selected 4-phenyl hydroxycoumarins in the zebrafish model and the computational molecular modeling studies. *Bioorganic Med Chem* 25:6286-6296.
- Veselinović JB, Veselinović AM, Nikolić GM, Pešić SZ, Stojanović DB, Matejić JS, y Mihajilov-Krstev TM (2015) Antibacterial potential of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: Integrated in vitro and molecular docking studies. *Med Chem Res* 24:1626-1634.
- Veselinović JB, Veselinović AM, Vitnik Ž, Vitnik VD, y Nikolić GM (2014) Antioxidant properties of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: Integrated in vitro and computational studies. *Chem Biol Interact* 214:49-56.
- Virginio C, Giacometti A, Aldegheri L, Rimland JM, y Terstappen GC (2002) Pharmacological properties of rat $\alpha 7$ nicotinic receptors expressed in native and recombinant cell systems. *Eur J Pharmacol* 445:153-161.
- Wang HL, Toghraee R, Papke D, Cheng XL, McCammon JA, Ravaioli U, y Sine SM (2009) Single-channel current through nicotinic receptor produced by closure of binding site C-loop. *Biophys J* 96:3582-3590.
- Wang J, Ferruzzi MG, Ho L, Blount J, Janle EM, Gong B, Pan Y, Gowda GAN, Raftery D, Arrieta-Cruz I, Sharma V, Cooper B, Lobo J, Simon JE, Zhang C, Cheng A, Qian X, Ono K, Teplow DB, Pavlides C, Dixon RA, y Pasinetti GM (2012) Brain-Targeted Proanthocyanidin Metabolites for Alzheimer's Disease Treatment. *J Neurosci* 32:5144-5150.
- Wang K, Hackett JT, Cox ME, Van Hoek M, Lindstrom J, y Parsons SJ (2004) Regulation of the Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor by Src Family Tyrosine Kinases. *J Biol Chem* 279:8779-8786.
- Wang Q, y Lynch JW (2011) Activation and desensitization induce distinct conformational changes at the extracellular-transmembrane domain interface of the glycine receptor. *J Biol Chem* 286:38814-38824.
- Wasowski C, y Marder M (2012) Flavonoids as GABAA receptor ligands: the whole story? *J Exp Pharmacol* 4:9-24.
- Williams DK, Peng C, Kimbrell MR, y Papke RL (2012) Intrinsically Low Open Probability of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Can Be Overcome by Positive Allosteric Modulation and Serum Factors Leading to the Generation of Excitotoxic Currents at Physiological Temperatures. *Mol Pharmacol* 82:746-759.
- Williams DK, Wang J, y Papke RL (2011a) Investigation of the molecular mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator PNU-120596 provides evidence for two distinct desensitized states. *Mol Pharmacol* 80:1013-32.
- Williams DK, Wang J, y Papke RL (2011b) Positive allosteric modulators as an approach to nicotinic acetylcholine receptor-targeted therapeutics: Advantages and limitations. *Biochem Pharmacol* 82:915-930.
- Williams ME, Burton B, Urrutia A, Shcherbatko A, Chavez-noriega LE, Cohen CJ, y Aiyar J (2005) Ric-3 Promotes Functional Expression of the Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ Subunit in Mammalian Cells. *J Biol Chem* 280:1257-1263.
- Williams RJ, Spencer JPE, y Rice-Evans C (2004) Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36:838-849.
- Winterer G, Gallinat J, Brinkmeyer J, Musso F, Kornhuber J, Thuerauf N, Rujescu D, Favis R, Sun Y, Franc MA, Ouwerkerk-Mahadevan S, Janssens L, Timmers M, y Streffer JR (2013) Allosteric alpha-7 nicotinic receptor modulation and P50 sensory gating in schizophrenia: A proof-of-mechanism study. *Neuropharmacology* 64:197-204.
- Wu J, Liu Q, Tang P, Mikkelsen JD, Shen J, Whiteaker P, y Yakel JL (2016) Heteromeric $\alpha 7\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain. *Trends Pharmacol Sci* 37:562-574.
- Wu J, Liu Q, Yu K, Hu J, Kuo YP, Segerberg M, St John PA, y Lukas RJ (2006) Roles of nicotinic acetylcholine receptor β subunits in function of human $\alpha 4$ -containing nicotinic receptors. *J Physiol* 576:103-118.
- Xiu X, Puskar NL, Shanata JAP, Lester HA, y Dougherty DA (2009) Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation- π interaction. *Nature* 458:534-537.
- Xu W, Orr-Urtreger A, Nigro F, Gelber S, Sutcliffe CB, Armstrong D, Patrick JW, Role LW, Beaudet AL, y De Biasi M (1999) Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the $\beta 2$ and the $\beta 4$ subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 19:9298-9305.
- Yakel JL, Lagrutta A, Adelman JP, y North RA (1993) Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus*

- oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 90:5030-5033.
- Yamodo IH, Chiara DC, Cohen JB, y Miller KW (2010) Conformational changes in the nicotinic acetylcholine receptor during gating and desensitization. *Biochemistry* 49:156-165.
- Yang T, Xiao T, Sun Q, y Wang K (2017) The current agonists and positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nAChR for CNS indications in clinical trials. *Acta Pharm Sin B* 7:611-622.
- Yoshikawa H, Kurokawa M, Ozaki N, Nara K, Atou K, Takada E, Kamochi H, y Suzuki N (2006) Nicotine inhibits the production of proinflammatory mediators in human monocytes by suppression of I- κ B phosphorylation and nuclear factor- κ B transcriptional activity through nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$. *Clin Exp Immunol* 146:116-123.
- Young GT, Zwart R, Walker AS, Sher E, y Millar NS (2008) Potentiation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci* 105:14686-14691.
- Yu CR, y Role LW (1998a) Functional contribution of the $\alpha 7$ subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurons. *J Physiol* 509:651-65.
- Yu CR, y Role LW (1998b) Functional contribution of the $\alpha 5$ subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurons. *J Physiol* 509:667-681.
- Yu X, Doroghazi JR, Janga SC, Zhang JK, Circello B, Griffin BM, Labeda DP, y Metcalf WW (2013) Diversity and abundance of phosphonate biosynthetic genes in nature. *Proc Natl Acad Sci* 110:20759-20764.
- Zanetti SR, Ziblat A, Torres NI, Zwirner NW, y Bouzat C (2016) Expression and Functional Role of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor in Human Cytokine-stimulated Natural Killer (NK) Cells. *J Biol Chem* 291:16541-16552.
- Zarei MM, Radcliffe KA, Chen D, Patrick JW, y Dani JA (1999) Distributions of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits on cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 88:755-764.
- Zhang J, Xue F, Liu Y, Yang H, y Wang X (2013) The structural mechanism of the cys-loop receptor desensitization. *Mol Neurobiol* 48:97-108.
- Zhao Y (2016) The Oncogenic Functions of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Oncol* 2016:1-9.
- Zhou Q, Verdoorn TA, y Lovinger DM (1998) Alcohols potentiate the function of 5-HT₃ receptor-channels on NCB-20 neuroblastoma cells by favouring and stabilizing the open channel state. *J Physiol* 507:335-352.
- Zoli M, Jansson A, Syková E, Agnati LF, y Fuxe K (1999) Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 20:142-150.
- Zoli M, Pistillo F, y Gotti C (2015) Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96:302-311.
- Zouridakis M, Papakyriakou A, Ivanov I, Kasheverov I, Tsetlin V, Tzartos SJ, y Giastas P (2019) Crystal Structure of the Monomeric Extracellular Domain of $\alpha 9$ Nicotinic Receptor Subunit in Complex With α -Conotoxin RglA: Molecular Dynamics Insights Into RglA Binding to $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Receptors. *Front Pharmacol* 10:1-14.
- Zwart R, De Filippi G, Broad LM, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, y Sher E (2002) 5-Hydroxyindole potentiates human $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology* 43:374-384.
- Zwart R, Strotton M, Ching J, Astles PC, y Sher E (2014) Unique pharmacology of heteromeric $\alpha 7\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Pharmacol* 726:77-86.

ABREVIATURAS

- $\alpha 7$ TSLMF:** receptor $\alpha 7$ quintuple mutante (S223T, A226S, M254L, I281M y V288F)
- $\alpha 7$ -5HT_{3A}:** receptor quimérico con el dominio extracelular de $\alpha 7$ y los dominios transmembrana e intracelular de 5-HT_{3A}
- α -Bgt:** α -bungarotoxina
- τ_{burst} :** constante de tiempo o duración del *burst*
- $\tau_{cluster}$:** constante de tiempo o duración del *cluster*
- $\tau_{crítico}$:** tiempo crítico
- τ_{lento} :** constante de decaimiento lenta de la corriente macroscópica
- τ_{open} :** constante de tiempo del estado abierto de mayor duración
- $\tau_{rápido}$:** constante de decaimiento rápida de la corriente macroscópica
- 4BP-TQS:** 4-(4-bromophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolina-8-sulfonamide
- 5-HI:** 5-hidroxiindol
- 5-HT:** 5-hidroxitriptamina o serotonina
- 5-HT_{3A}:** receptor de serotonina tipo 3A
- AC:** adenilato ciclasa
- ACh:** acetilcolina (del inglés: *Acetylcholine*)
- AChBP:** proteína unidora de acetilcolina (del inglés: *ACh binding protein*)
- AChE:** acetilcolinesterasa
- ACN:** acetonitrilo
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario
- AGS:** tripéptidos de Alanina-Glicina-Serina
- Akt o PKB:** proteína quinasa B (del inglés: *Protein Kinase B*)
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNc:** ácido ribonucleico complementario
- CE:** concentración efectiva
- Ch:** colina (del inglés: *Choline*)
- ChAT:** colina acetiltransferasa
- Cm:** capacitancia de membrana
- CMV:** citomegalovirus
- CuNPs/C:** nanopartículas de cobre soportadas por carbón activado
- DCF:** diclorofluoresceína
- DCFDA:** 2',7'-diclorofluoresceína diacetato
- DCM:** diclorometano
- DH β E:** dihidro- β -eritroidina
- DMEM:** medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMF:** dimetilformamida
- ECD:** dominio extracelular (del inglés: *Extracellular Domain*)
- ECS:** solución extracelular (del inglés: *Extracellular Solution*)
- ER:** enzimas de restricción
- ERK:** quinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés: *Extracellular signal-Regulated Kinases*)
- GABA:** ácido γ -aminobutírico
- Gen:** genisteína
- GFP:** proteína fluorescente verde (del inglés: *Green Fluorescence Protein*)
- GLIC:** canal iónico activado por ligando de *Gloeobacter violaceus* (del inglés: *Gloeobacter violaceus Ligand-gated Ion Channel*)
- Glu:** glutamato
- Gly:** glicina
- GPCR:** receptor acoplado a proteína G (del inglés: *G-Protein Coupled Receptor*)
- HC:** alta conductancia (del inglés: *High Conductance*)
- HEK293:** células embrionarias de riñón humano (del inglés: *Human Embryonic Kidney 293*)
- HO-1:** hemooxigenasa I
- ICD:** dominio intracelular (del inglés: *Intracellular Domain*)
- ICS:** solución intracelular (del inglés: *Intracellular Solution*)

Im: corriente de membrana
IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (del inglés: *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
IVM: ivermectina
IκB: inhibidor de NF-κB
JAK2: Janus quinasa 2 (del inglés: *Janus Kinase 2*)
LC: baja conductancia (del inglés: *Low Conductance*)
LGIC: canales iónicos activados por ligando (del inglés: *Ligand-Gated Ion Channels*)
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés: *Mitogen-Activated Protein Kinases*)
MLA: metillicaconitina
nAChRs: receptores nicotínicos de acetilcolina (del inglés: *nicotinic Acetylcholine Receptors*)
NAM: modulador alostérico negativo (del inglés: *Negative Allosteric Modulator*)
Neo: neoflavonoide 5,7-dihidroxi-4-fenilcumarina
NF-κB: factor nuclear kappa B (del inglés: *Nuclear Factor Kappa B*)
NMDA: N-metil-D-aspartato
Nrf-2: factor 2, relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (del inglés: *Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2*)
NS-1738: N-(5-cloro-2-hidroxifenil)-N'-[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]urea
NT: neurotransmisor/es
OE-PCR: PCR de extensión por solapamiento (del inglés: *Overlap Extension PCR*)
PAM: modulador alostérico positivo (del inglés: *Positive Allosteric Modulator*)
PBS: *buffer* fosfato salino (del inglés: *Phosphate Buffered Saline*)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*)
PDB: banco de datos de proteínas (del inglés: *Protein Data Bank*)
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa (del inglés: *Phosphatidylinositol 3-Kinase*)
PKC: proteína quinasa C (del inglés: *Protein Kinase C*)
pLGICs: canales iónicos pentaméricos activados por ligando (del inglés: *pentameric Ligand-Gated Ion Channels*)
PNU-120596: (N-(5-cloro-2,4-dimetoxifenil)-N'-(5-metil-3-isoxazolil)-urea
PNU-282987: N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-4-clorobenzamida clorhidrato
Que: quercetina
Re: resistencia del electrodo
Ric-3: chaperona Ric-3 (del inglés: *Resistant to Inhibitors of Cholinesterase 3*)
Rm: resistencia de membrana
ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés: *Reactive Oxygen Species*)
SAM: modulador alostérico silente (del inglés: *Silent Allosteric Modulator*)
SAR: relación estructura-actividad (del inglés: *Structure-Activity Relationship*)
SD: desviación estándar (del inglés: *Standard Deviation*)
SEM: error estándar de la media (del inglés: *Standard Error of the Mean*)
SLURP-1: proteína 1 secretada relacionada a Ly-6/uPAR (del inglés: *Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1*)
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
SOS: solución estándar de ovocitos (del inglés: *Standard Oocyte Solution*)
STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3 (del inglés: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*)
TEA: trietilamina
TEVC: *voltage-clamp* de dos electrodos (del inglés: *Two-Electrode Voltage Clamp*)
THF: tetrahidrofolato
TMD: dominio transmembrana (del inglés: *Transmembrane Domain*)
TMEM35 o NACHO: chaperona NACHO o proteína transmembrana 35 (del inglés: *Transmembrane Protein 35*)
TMSBr: bromotrimetilsilano
TQS: 4-nafatlen-1-il-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinolina-8-sulfónico amida
Vc: voltaje comando de interés
Vm: voltaje o potencial de membrana
VOCCs: canales de calcio operados por voltaje (del inglés: *Voltage-Operated Calcium Channels*)
WT: salvaje (del inglés: *Wild – Type*)

PUBLICACIONES

- Andersen N.D., **Nielsen B.E.**, Corradi J., Tolosa M.F., Feuerbach D., Arias H. y Bouzat, C. (2016) Exploring the positive allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic receptors from a single-channel perspective. *Neuropharmacology* 107:189-200.
- Bouzat C., Lasala M., **Nielsen B.E.**, Corradi J. y Esandi M.C. (2017) Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. *J Physiol* 596:1847-1861.
- **Nielsen B.E.**, Minguez T., Bermudez I. y Bouzat C. (2018) Molecular function of the novel $\alpha 7\beta 2$ nicotinic receptor. *Cell Mol Life Sci.* 75:2457-2471.
- **Nielsen B.E.**, Bermudez I. y Bouzat C. (2019) Flavonoids as positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 160: 107794.