



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

Factores extrínsecos  
condicionantes de la función de  
receptores *Cys-loop*:  
Relevancia fisiológica y  
patológica

Camila Fabiani

Bahía Blanca

Argentina

2021



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 Doctora en Biología 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 09 de agosto de 2016 y el 30 de Noviembre de 2020, bajo la dirección de la Doctora Silvia Antollini, Investigadora independiente de CONICET y Profesora adjunta de la Universidad Nacional del Sur, y la codirección del Doctor Jeremías Corradi, investigador adjunto de CONICET y Asistente docente de la Universidad Nacional del Sur.

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Sur, por haberme dado la posibilidad de formarme tanto académica como personalmente durante todos los años que pasé, y sigo pasando, ahí. Al INIBIBB y al CONICET, por brindarme el espacio y los recursos económicos para poder desarrollar mi Tesis Doctoral.

A las personas del INIBIBB que compartieron conmigo este camino, por todas las charlas, los mates y las risas (y algunos llantos también). A Mela, Gabi, Romi, Juan Pablo, Leti, Ari.. a Meli y Nati por escucharme y aconsejarme siempre, a Mati y Orne, porque no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A mi directora, Silvia, por haberme enseñado y transmitido sus conocimientos y experiencia pero sobre todo por la paciencia y el cariño, por aguantar mis crisis y tener siempre palabras para tranquilizarme (o al menos intentarlo), cualquier día y a cualquier hora. Gracias por todo lo que compartimos adentro y afuera del laboratorio.

A mi codirector, Jere, por su tiempo y por enseñarme con dedicación y paciencia.

A los pseudobiólogos, los amigos que me dejó la carrera y que me acompañan desde hace ya diez años. Por las cervezas en Wir Können (o en cualquier lado), las cenas, las charlas infinitas, los viajes. Por estar en mis mejores y peores momentos. Porque anécdotas sobran, agradezco que la vida (y la biología, aunque nunca sepamos “que bicho” o “que planta” es) nos haya cruzado.

A mis amigas, por todos los momentos compartidos durante todos estos años que hacen que la vida sea mejor.

A mis papás, por absolutamente todo. Por las palabras, el apoyo y los abrazos en los momentos más difíciles, y por querer y compartir siempre mi felicidad. Y a Mateo, por ser mi hermano (con todo lo que eso significa). No hubiera podido sin ustedes.

30 de Noviembre de 2020

Camila Fabiani

**Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

# Factores extrínsecos condicionantes de la función de receptores *Cys-loop*: Relevancia fisiológica y patológica

## RESUMEN

Dentro de la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando (LGIC) se encuentra la familia de los receptores *Cys-loop* que incluye a canales catiónicos, como los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) y los receptores 5-HT<sub>3</sub> de serotonina; y canales aniónicos, como los activados por GABA (GABA<sub>A</sub>) y glicina. Estos receptores revisten importancia tanto en la fisiología normal como así también en diversas y muy variadas patologías, entre las que se pueden mencionar las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA). Este hecho los posiciona como blancos moleculares importantes para el desarrollo de nuevos fármacos, y es por esto que el conocimiento de su función y modulación resulta un aspecto clave.

Los receptores *Cys-loop* son proteínas transmembrana, por lo que su función se encuentra condicionada por su entorno lipídico y estímulos propios de la membrana celular, además de por distintos estímulos o factores externos a ella. Están formados por 5 subunidades organizadas pseudo-simétricamente alrededor de un poro o canal central. En estos receptores pueden distinguirse un dominio extracelular (ECD, del inglés *extracellular domain*), donde se encuentran los sitios de unión al agonista y/o antagonistas, un dominio transmembrana (TMD, del inglés *transmembrane domain*), que contiene el canal iónico y que se encuentra en extenso contacto con los lípidos de la membrana, y un dominio pequeño intracelular (ICD, del inglés *intracellular domain*), que contiene distintos sitios de regulación y señalización intracelular.

En esta Tesis Doctoral se profundizó en el estudio de la función y modulación de 2 receptores de neurotransmisores pertenecientes a los receptores *Cys-loop*: los nAChRs, muscular y  $\alpha 7$  neuronal, y los receptores 5-HT<sub>3</sub>.

En el **capítulo I** se estudió la modulación del nAChR muscular por el entorno lipídico de la membrana en la que se encuentra. Se hizo foco especialmente en el colesterol (Col), lípido clave para el correcto funcionamiento del nAChR y que presenta distintas asimetrías laterales y transmembrana en diferentes momentos de la vida y en condiciones de salud o enfermedad. Se trabajó con distintos sistemas modelo: vesículas unilamelares grandes (LUVs), vesículas unilamelares gigantes (GUVs), membranas ricas en nAChR de

*T. californica* o células BOCSC 23 expresando heterológicamente el nAChR muscular. A cada uno se le realizaron distintos tratamientos para modificar las condiciones de Col con el fin de obtener sistemas que presenten: i) un aumento del contenido de Col, ii) un aumento de esteroides en la hemicapa externa (por agregado de colesterol hemisuccinato (CHEMS)), o iii) transformación de parte del Col a colesteno (por la enzima colesterol oxidasa (Cox)). Mediante estudios de fluorescencia utilizando las sondas DPH, TMA-DPH y Laurdan se determinó que el orden de membrana aumentó cuando se incorporó CHEMS. Mediante estudios de espectrofotometría utilizando la sonda cristal violeta (CrV) y la técnica de *patch-clamp* se detectaron, respectivamente, modificaciones conformacionales en el nAChR y cambios en la activación del mismo cuando los diferentes sistemas habían sido incubados con CHEMS o Cox, no así con Col. Tratando LUVs con Tritón, y posterior centrifugación y separación por SDS-PAGE, se determinó que luego de la incorporación de Col o CHEMS al sistema, el nAChR se localizó mayoritariamente en fracciones ordenadas, mientras que cuando se produjo la transformación del Col a colesteno el receptor se localizó principalmente en fracciones desordenadas. Por último, estudios de microscopía confocal utilizando GUVs mostraron que alteraciones en el Col causaron cambios significativos en la presencia y distribución de dominios ordenados y desordenados; y que la presencia de un componente proteico en el sistema, como es un péptido representativo del segmento transmembrana  $\gamma$ TM4 del nAChR, alteró las características de la membrana, llevando a todo el sistema a un mayor orden. De acuerdo con estos resultados, distintas modificaciones del Col en la membrana llevan a cambios de su orden y asimetría, y al mismo tiempo a cambios en la localización del nAChR en un determinado entorno, hecho que repercute directamente en su funcionalidad. Su localización en dominios ordenados ocasiona una disminución de su actividad, mientras que su presencia en dominios más desordenados lleva a un aumento de su función. De esta manera, la localización del nAChR en uno u otro dominio podría explicar los cambios en la señal colinérgica reportados en situaciones de envejecimiento y/o patologías como la EA.

Existen numerosas evidencias de interacciones funcionales entre los péptidos  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), involucrados en la enfermedad de Alzheimer, y el nAChR  $\alpha$ 7. En el **capítulo II** se estudió la modulación del nAChR  $\alpha$ 7 neuronal por oligómeros de A $\beta$ <sub>1-40</sub> y A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Se ha postulado que la acumulación excesiva de estos péptidos en el cerebro provoca la formación de placas seniles, directamente relacionadas con el proceso de neurodegeneración e inflamación característico de esta enfermedad. Sin embargo, evidencias más recientes sugieren que las especies más neurotóxicas serían las formas oligoméricas de A $\beta$ . Mediante estudios de fluorescencia utilizando la sonda CrV se demostró que los oligómeros de A $\beta$

provocan cambios conformacionales en el receptor  $\alpha 7$ . Utilizando la técnica de *patch clamp* se determinó que dichos oligómeros son capaces de activar al receptor  $\alpha 7$  en muy bajas concentraciones y que, a concentraciones más altas, disminuyen la potenciación de  $\alpha 7$  por moduladores alostéricos positivos (PAMs, *positive allosteric modulators*). Estos resultados muestran un rol dual de los oligómeros de A $\beta$  dependiente de su concentración, como agonistas y como moduladores negativos de  $\alpha 7$ . El efecto agonista, potenciador de la señal colinérgica, podría tener un rol importante en la fisiología normal del individuo, mientras que el efecto inhibitorio, dado por su exacerbada producción, podría contribuir a la deficiencia en la memoria y cognición asociada a la EA.

Teniendo en cuenta las características multifactoriales de la EA, la estrategia de búsqueda de nuevas moléculas apunta al descubrimiento y desarrollo de “*multitarget drugs*”, es decir de moléculas activas en varios blancos moleculares, por lo que el **capítulo III** se centró en el descubrimiento y optimización de nuevas moléculas bifuncionales que sean capaces de activar al nAChR e inhibir a la acetilcolinesterasa (ACE). Partiendo de un *screening* de extractos obtenidos de distintas plantas medicinales, mediante técnicas cromatográficas y de resonancia magnética nuclear se identificó a la molécula de cafeína como una molécula sumamente interesante para la EA. Además de confirmar su ya conocida actividad inhibidora de la ACE, utilizando técnicas de espectrofotometría con la sonda fluorescente CrV y de *patch-clamp*, en este trabajo se postula su actividad agonista sobre los nAChRs muscular y  $\alpha 7$  neuronal. Caracterizada la actividad de la cafeína sobre el sistema colinérgico, se obtuvieron luego 5 análogos sintéticos de esta molécula mediante diseño racional. Se determinó que todos los análogos presentan actividad sobre ambos blancos moleculares, la ACE y los nAChRs, y cuya potencia es mayor a la de la cafeína. Mediante estudios de modelado molecular y *docking* se identificaron los sitios de inhibición de los análogos de la cafeína en la ACE y de interacción con el nAChR permitiendo postular a estos compuestos como agonistas parciales. Estos hallazgos resultan prometedores en la búsqueda de nuevos fármacos como una estrategia terapéutica para la EA.

El otro receptor estudiado en este trabajo de Tesis fue el receptor 5-HT<sub>3</sub>, uno de los menos conocidos de la familia de los *Cys-loop*, el cual a nivel presináptico participa de la finalización de la señal nerviosa, tornándose un blanco molecular novedoso tanto en la EA como en otras patologías neurodegenerativas que requieran una potenciación de dicha señal. En el **capítulo IV**, utilizando el receptor de alta conductancia 5-HT<sub>3AHC</sub>, se descifraron por primera vez las diferencias entre la activación ortostérica del mismo y su activación alostérica por timol y carvacrol. Mediante la técnica de *patch clamp*, combinando registros de corrientes macroscópicas en la configuración *whole-cell* y de canal

único en la configuración *cell-attached*, se caracterizó en primer lugar la activación del receptor humano 5-HT<sub>3AHC</sub> por los agonistas ortostéricos 5-HT y triptamina, y luego la activación alostérica mediada por 2 terpenoides, carvacrol y timol. Se confirmó que tanto el carvacrol como el timol se comportan macroscópicamente como agonistas menos eficaces que 5-HT. Sin embargo, a nivel de canal único, estos 2 terpenoides activan a los receptores 5-HT<sub>3A</sub> con mayor eficacia que 5-HT. Más aún, se determinó que además de actuar como agonistas, el carvacrol y el timol actúan como moduladores alostéricos positivos del receptor 5-HT<sub>3AHC</sub> humano, y que el efecto potenciador es evidente a concentraciones menores que el efecto agonista. De esta manera, los resultados de este capítulo permitieron definir las bases mecánicas que subyacen a las diferencias entre la activación y potenciación alostérica u ortostérica del receptor humano 5-HT<sub>3A</sub>.

En resumen, en este trabajo de Tesis se profundizó en el conocimiento de distintas formas de modulación de los nAChRs y del receptor 5-HT<sub>3</sub>, ya sea por moléculas exógenas o por el entorno lipídico en el que se encuentran, brindando bases moleculares para el entendimiento de su función, su modulación y su afección en determinadas patologías como la EA. En este trabajo se lograron avances significativos, con resultados de gran relevancia, ya sea para el estudio o tratamiento de esta enfermedad.

# Extrinsic factors affecting *Cys-loop* receptor function: Physiological and pathological relevance

## SUMMARY

*The Cys-loop* receptor family, which belongs to the Ligand-gated ion channel (LGIC) superfamily, includes cation channels, such as nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors, and anion channels, such as those activated by GABA (GABA<sub>A</sub>) and glycine. These receptors are important in normal physiology and in various pathologies, among which neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), are included. They are therefore important molecular targets for the development of new drugs, this being the reason why the knowledge of their function is indeed a very interesting aspect worth exploring.

*Cys-loop* receptors are integral membrane proteins whose function is conditioned by their lipid environment as well as by different extrinsic factors. These receptors are formed by five subunits organized pseudo-symmetrically around a central pore. Three different domains can be distinguished: an extracellular domain (ECD), where the agonist and/or antagonist binding sites are localized, a transmembrane domain (TMD), which contains the ion pore and is in extensive contact with membrane lipids, and a small intracellular domain (ICD), which is important for the conductance of the channel and modulation.

In this Doctoral Thesis, the function and modulation of two neurotransmitter receptors that belong to the *Cys-loop* receptor family, nAChRs and 5-HT<sub>3</sub> receptors, were explored by using a large variety of fluorescence, confocal microscopy and electrophysiological approaches.

In **Chapter I**, modulation of the muscle nAChR by its lipid environment was studied. Special attention was put on cholesterol (Chol), which displays different lateral and transmembrane asymmetries all throughout life as well as under health and disease conditions. This lipid is crucial for the proper functioning of the nAChR. Different model systems were used: large unilamellar vesicles (LUVs), giant unilamellar vesicles (GUVs), *T. californica* nAChR rich membranes and BOSC 23 cells heterologously expressing the muscle nAChR. The experimental systems were subjected to different treatments to modify their Chol conditions resulting in: i) an increment in Chol content, ii) an increment in sterols in the outer layer (after addition of cholesteryl hemisuccinate (CHEMS)), and

iii) conversion of part of the Chol to cholestenone (through the enzyme Cholesterol Oxidase (ChOx)). Through fluorescence studies using DPH, TMA-DPH and Laurdan probes it was determined that the membrane order increased when CHEMS was incorporated. By using the fluorescent probe Crystal Violet (CrV) and *patch-clamp* recordings, conformational changes of the nAChR associated to changes in its activation properties were detected after incubation with either CHEMS or ChOx, but not with Chol. By treating LUVs with Triton, and subsequent centrifugation and separation by SDS-PAGE, it was determined that after incorporation of Chol or CHEMS to the system the nAChR was located mostly in ordered fractions, while after the conversion of Chol to cholestenone the receptor was found in disordered fractions. Confocal microscopy studies using GUVs showed that Chol alterations caused significant changes in the presence and distribution of ordered and disordered domains, and that the mere presence of a protein component in the system, specifically a peptide corresponding to the fourth transmembrane segment of the nAChR (M4), led to a higher order of the entire system. According to our results, we conclude that modifications of membrane Chol lead to changes in membrane order and asymmetry, and, at the same time, in the location of the nAChR, a fact that would directly affect its functionality. The location of the nAChR in ordered domains causes a decrease in its activity whereas its location in more disordered domains enhances its function. In this way, the location of the nAChR in one or another domain fine-tunes its function and could explain the changes in the cholinergic signal reported in situations of aging and/or pathologies, such as AD.

There is increasing evidence of functional interactions between  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) peptides, involved in Alzheimer's disease, and  $\alpha 7$  nAChR. In **Chapter II**, modulation of  $\alpha 7$  nAChR by A $\beta_{1-40}$  and A $\beta_{1-42}$  oligomers was studied. It has been postulated that the accumulation of these peptides in the brain causes the formation of senile plaques, which are directly related to the neurodegeneration and inflammation observed in AD. However, more recent evidence suggests that the most neurotoxic species are the oligomeric forms of A $\beta$ . Fluorescence studies using the CrV probe demonstrated that A $\beta$  oligomers cause conformational changes in the  $\alpha 7$  receptor, which were dependent on the concentration. Accordingly, single channel recordings revealed that whereas at very low concentrations (pM to nM range) these oligomers are capable of activating the  $\alpha 7$  receptor, at higher concentrations, which are compatible with those found in AD patients, they decrease the enhancement of  $\alpha 7$  by positive allosteric modulators (PAMs). These results show a dual role of A $\beta$  oligomers depending on their concentration, as agonists and as negative modulators of  $\alpha 7$ . The agonist effect, which enhances the cholinergic signal, could have an

important role in normal physiology, while the inhibitory effect, given by the exacerbated production of A $\beta$ , could contribute to the failure in memory and cognition associated with AD.

Taking into account that Alzheimer's is a multifactorial disease, the search for new molecules aims at discovering and developing "multitarget drugs". **Chapter III** is focused on the discovery and optimization of new bifunctional molecules capable of activating the nAChR and inhibiting the AChE. Starting from a screening of extracts obtained from different medicinal plants and using chromatographic techniques and nuclear magnetic resonance, the caffeine molecule was identified as a highly interesting molecule for AD. In addition to its already known AChE inhibitory activity, using CrV fluorescence probe and *patch-clamp* techniques we postulated its agonist activity in the muscle and  $\alpha 7$  nAChRs. After having characterized the activity of caffeine in the cholinergic system, five synthetic analogs of this molecule were obtained by rational design. It was determined that all the analogs have activity in both molecular targets, the AChE and the nAChRs, and that they have a greater potency than caffeine. Through docking studies, the sites of inhibition of caffeine analogs in the AChE and the sites of interaction with the nAChRs were proposed. These compounds are promising as new drugs for a therapeutic strategy for AD.

The other receptor explored in this Thesis was the 5-HT<sub>3</sub> receptor, one of the least known of the *Cys-loop* family, which has been recently proposed as a novel molecular target both in AD and in other neurodegenerative pathologies. In **Chapter IV**, by taking advantage of the high-conductance receptor 5-HT<sub>3A<sub>H</sub>C</sub>, differences between orthosteric and allosteric activation of the human 5-HT<sub>3A</sub> receptor were deciphered for the first time. By using the *patch clamp* technique, and combining macroscopic current recordings in the *whole-cell* configuration and single channel recordings in the *cell-attached* configuration, the activation of the human 5-HT<sub>3A<sub>H</sub>C</sub> receptor by the orthosteric agonists, 5-HT and tryptamine, and the allosteric activation, by carvacrol and thymol, were described. Both carvacrol and thymol were less effective agonists than 5-HT at the macroscopic level. However, at the single channel level, these two terpenoids activated 5-HT<sub>3A</sub> receptors more efficiently than 5-HT. Furthermore, it was demonstrated that in addition to acting as agonists, carvacrol and thymol behave as positive allosteric modulators of the human 5-HT<sub>3A<sub>H</sub>C</sub> receptor at low concentrations. In this way, these results made it possible to define the mechanistic bases underlying the differences between orthosteric and allosteric activation and potentiation of the human 5-HT<sub>3A</sub> receptor.

Summing up, in this Doctoral Thesis we deepened into the knowledge of modulation of the nAChRs and the 5-HT<sub>3</sub> receptor, either by extrinsic molecules or by the lipid environment in which they are located. Our findings provide molecular bases for the understanding of the function and modulation of these receptors and their implication in certain pathologies, such as AD. In this work, significant advances with highly relevant results were made for the study or treatment of this disease.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	I
<b>SUMMARY</b> .....	V
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Sistema nervioso.....	2
2. Canales iónicos activados por ligando.....	4
Estructura.....	5
Estados conformacionales y activación.....	6
2.1. Receptores nicotínicos de acetilcolina.....	8
Estructura.....	8
Activación por acetilcolina.....	10
2.1.1. Receptor nicotínico muscular.....	12
Estructura.....	12
Localización y función.....	12
nAChR de <i>T. californica</i> como modelo de estudio.....	13
2.1.2. Receptor nicotínico $\alpha 7$ neuronal.....	14
Estructura.....	15
Localización y función.....	15
2.2. Receptores de serotonina.....	16
Estructura.....	17
Activación por serotonina.....	17
Localización y función.....	18
3. Membrana plasmática.....	19
<i>Rafts</i> de membrana.....	21
4. Interacción lípidos - Receptor nicotínico.....	23
Entorno lipídico del nAChR.....	24
El nAChR en la membrana.....	27
Rol del segmento TM4 del nAChR.....	30
5. Enfermedad de Alzheimer.....	30
Colesterol y A $\beta$ : hipótesis de la cascada amiloide.....	31
Receptores nicotínicos y acetilcolinesterasa: hipótesis colinérgica.....	36
<b>METODOLOGÍA</b> .....	40
1. MATERIALES.....	41
2. PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MODELOS DE ESTUDIO.....	41
2.1. Preparación de membranas de <i>Torpedo Californica</i> .....	41
2.1.1. Obtención de membranas crudas.....	41
2.1.2. Obtención de membranas ricas en nAChR.....	42
2.1.3. Obtención de proteoliposomas de nAChR.....	42
Preparación de la columna de afinidad.....	42
Purificación del nAChR y reconstitución de proteoliposomas.....	43
2.2. Obtención de liposomas grandes unilamelares (LUVs).....	44
2.3. Obtención de liposomas gigantes unilamelares (GUVs).....	45
2.4. Cultivo celular y transfección.....	46
2.5. Modificación del colesterol de membrana.....	47
2.6. Separación de fragmentos de membrana según la solubilidad en detergentes.....	48
2.7. Preparación de extractos de hojas de <i>C. sinensis</i> .....	49
2.7.1. Extractos metanólicos.....	49
2.7.2. Fracciones aisladas a partir del extracto metanólico.....	49
2.8. Obtención de análogos de cafeína.....	49
3. MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	51
3.1. Cuantificación proteica por el método de Lowry.....	51
3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS- PAGE).....	51
3.3. Cromatografía en capa fina (TLC).....	52

3.4 Mediciones de fluorescencia.....	52
3.4.1. Medición de la polarización generalizada.....	53
3.4.2. Medición de la anisotropía de fluorescencia.....	54
3.4.3. Mediciones de fluorescencia con cristal violeta.....	55
3.4.4. Mediciones con $\alpha$ -Bungarotoxina fluorescente.....	57
3.5. Determinación de la temperatura de miscibilidad de GUVs.....	57
3.6. Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP) en GUVs.....	58
3.7. Estudios de inhibición de la acetilcolinesterasa.....	58
3.8. Aislamiento e identificación de los compuestos activos presentes en los extractos de <i>C. sinensis</i> .....	59
3.9. Experimentos de electrofisiología.....	59
3.9.1. Registros de canal único.....	60
3.9.2. Registros de corrientes macroscópicas.....	61
3.10. Modelado molecular y <i>docking</i> .....	62
3.11. Análisis estadístico.....	63
<b>CAPÍTULO I</b> .....	64
INTRODUCCIÓN.....	65
OBJETIVOS.....	67
RESULTADOS.....	69
1. Modificaciones del contenido de colesterol.....	69
2. Modificaciones del orden de membrana.....	70
3. Efectos del colesterol de membrana sobre la funcionalidad del nAChR.....	74
4. Activación del nAChR en células expuestas a CHEMS y Cox.....	76
5. Relación entre el colesterol de membrana y la distribución de nAChR en dominios Lo y/o Ld.....	80
6. Modificaciones del colesterol de membrana y formación de dominos Lo.....	81
DISCUSIÓN.....	90
<b>CAPÍTULO II</b> .....	101
INTRODUCCIÓN.....	102
OBJETIVOS.....	104
RESULTADOS.....	105
1. Cambios conformacionales del nAChR $\alpha 7$ inducidos por oligómeros de A $\beta$ .....	105
2. Activación del nAChR $\alpha 7$ neuronal por oligómeros de A $\beta$ .....	107
3. Cambios en la activación del nAChR $\alpha 7$ por oligómeros de A $\beta$ en altas concentraciones.....	110
DISCUSIÓN.....	112
<b>CAPÍTULO III</b> .....	116
INTRODUCCIÓN.....	117
OBJETIVOS.....	121
<b>PARTE I</b> .....	122
RESULTADOS.....	123
1. Identificación de los compuestos activos presentes en los extractos de <i>C. sinensis</i> .....	126
2. Inhibición de la acetilcolinesterasa por la cafeína.....	128
3. Efectos de la cafeína sobre los nAChRs muscular y $\alpha 7$ neuronal.....	130
3.1. Cambios conformacionales del nAChR muscular inducidos por la cafeína.....	130
3.2. Modulación de la funcionalidad de los nAChRs por la cafeína.....	132
4. Sitios de unión de la cafeína a los nAChRs muscular y $\alpha 7$ neuronal.....	137
<b>PARTE II</b> .....	140
RESULTADOS.....	141
1. Inhibición de la acetilcolinesterasa por los análogos de la cafeína.....	142
2. Efecto de los análogos de la cafeína sobre el nAChR muscular.....	143
2.1. Cambios conformacionales del nAChR muscular inducidos por los análogos de la cafeína.....	143
2.2. Modulación de la funcionalidad de los nAChRs por los análogos de la cafeína.....	145

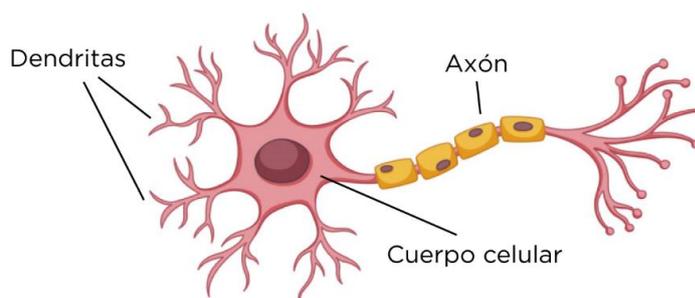
3. Sitios de unión de los análogos de la cafeína a la acetilcolinesterasa y los nAChRs.....	149
DISCUSIÓN.....	156
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	165
INTRODUCCIÓN.....	166
OBJETIVOS.....	169
RESULTADOS.....	170
1. Activación del receptor 5-HT <sub>3AHC</sub> por ligandos ortostéricos y alostéricos a nivel macroscópico.....	170
2. Potenciación del receptor 5-HT <sub>3AHC</sub> por carvacrol y timol a nivel macroscópico.....	172
3. Activación del receptor 5-HT <sub>3AHC</sub> por agonistas ortostéricos a nivel de canal único.....	173
4. Activación del receptor 5-HT <sub>3AHC</sub> por carvacrol y timol a nivel de canal único...	176
5. Potenciación del receptor 5-HT <sub>3AHC</sub> por carvacrol y timol a nivel de canal único.....	177
DISCUSIÓN.....	179
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	182
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	186
<b>ABREVIATURAS</b> .....	209

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso es un complejo conjunto de células encargadas de dirigir, supervisar y controlar todas las funciones y actividades de los distintos órganos del organismo. En animales vertebrados, el mismo puede dividirse en un sistema nervioso central (SNC), que consiste en el cerebro y la médula espinal, y un sistema nervioso periférico (SNP), formado por nervios aferentes y eferentes que conectan el SNC con distintas partes del cuerpo, y por distintos ganglios periféricos (Hill *et al.*, 2004).

El SNC está constituido principalmente por tejido neural, formado por neuronas y células gliales, y por células del tejido conectivo y del sistema circulatorio. Las neuronas son las unidades funcionales y estructurales del sistema nervioso especializadas en generar y transmitir impulsos eléctricos. En el cerebro humano existe una cantidad extraordinaria de estas células (los últimos estudios hablan de entre 86 y 100 mil millones de neuronas), que, a su vez, pueden ser clasificadas en distintos tipos, todos con una estructura básica común (Saladin, 2011). Las neuronas están formadas por el cuerpo celular o soma, sitio de integración de las señales que llegan y de generación del impulso nervioso; las dendritas, extensiones del cuerpo celular especializadas en la recepción del impulso sináptico desde otras neuronas; y el axón, cuya función principal es la transmisión de la información desde el soma hacia otras neuronas o células efectoras, y que en su porción final pierde la vaina de mielina y se divide en varias terminales presinápticas (Saladin, 2011) (Figura 1).

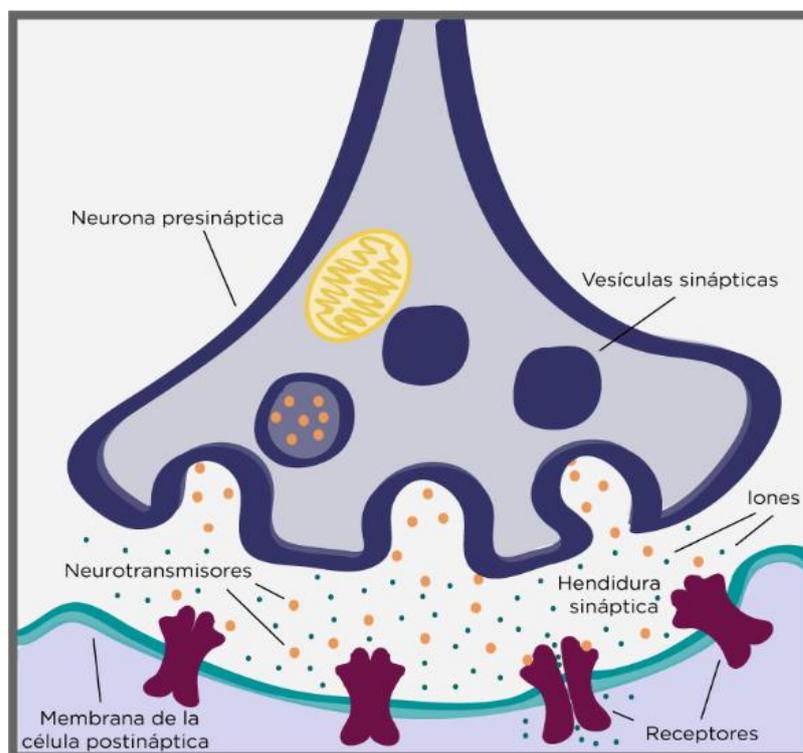


**Figura 1.** Estructura general de una neurona.

Las neuronas poseen la capacidad de comunicarse entre ellas y con sus sistemas efectores muy rápidamente y con alta precisión. Esto es fundamental para innumerables procesos, tales como el movimiento muscular voluntario, aprendizaje, memoria y percepción. La zona especializada para la comunicación entre una neurona y otra, o entre una neurona y otra célula blanco o efectora, se denomina sinapsis (Purves *et al.*, 2001)

Existen dos tipos de sinapsis: eléctricas y químicas. Las sinapsis eléctricas, aunque son más características de animales invertebrados y vertebrados inferiores, también se han observado en algunas zonas del sistema nervioso de mamíferos. En este tipo de sinapsis las membranas de las neuronas presinápticas se encuentran conectadas con las membranas de las neuronas postsinápticas por uniones de tipo “*gap*”, o uniones en hendidura, a través de las cuales fluye la corriente eléctrica de una célula a otra de forma directa generando ya sea una despolarización o una hiperpolarización de la membrana celular. Estas conexiones eléctricas son normalmente excitatorias y de corta duración, bidireccionales y con poca plasticidad (Purves *et al.*, 2001).

Las sinapsis químicas son el principal proceso de comunicación en el sistema nervioso de mamíferos. En este tipo de sinapsis las membranas plasmáticas de las neuronas involucradas (o de una neurona con una célula postsináptica) se encuentran separadas por un espacio de 20 a 30 nm, la hendidura sináptica. En las sinapsis químicas, cuando un potencial de acción llega a la terminal presináptica produce una despolarización que lleva a la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y, en consecuencia, a un aumento localizado de calcio en el citoplasma (Zimmermann, 1979; Ceccarelli y Hurlbult, 1980). La neurona presináptica posee en su terminal axónica vesículas que almacenan moléculas pequeñas denominadas neurotransmisores. El aumento local de calcio causa la fusión de estas vesículas con la membrana presináptica produciendo, por exocitosis, la liberación de su contenido a la hendidura sináptica (Heuser y Reese, 1981). Los neurotransmisores así liberados difunden a través de la hendidura sináptica y se unen luego, mayoritariamente, a receptores específicos en la célula postsináptica (Matthews-Belinger y Salpeter, 1978). Estos receptores, receptores activados por ligando, reconocen al neurotransmisor y de esa forma median diferentes respuestas sinápticas (Figura 2). Otra parte de esos neurotransmisores liberados puede salir de la hendidura sináptica y activar receptores más distantes, o activar receptores propios de la neurona presináptica (generalmente produciendo un control o *feedback* negativo de su liberación, y, de esta manera, regulando la duración de la señal).



**Figura 2.** Esquema general de la sinapsis química.

Los receptores de neurotransmisores localizados en la membrana postsináptica se clasifican en dos grandes grupos: receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos forman canales iónicos que permiten el paso de ciertos iones a través de la membrana plasmática luego de su activación por la unión de los ligandos específicos. A este grupo pertenece la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando (LGIC por sus siglas en inglés: *ligand gated ion channel*). Los receptores metabotrópicos son también activados por ligando pero se encuentran acoplados a proteínas G asociadas a diferentes cascadas de señalización y ejercen, en general, una acción moduladora sobre la transmisión sináptica. Estos dos tipos de receptores varían en la velocidad de su respuesta, siendo los primeros responsables de mediar las sinapsis rápidas (Purves *et al.*, 2001)

## 2. CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR LIGANDO

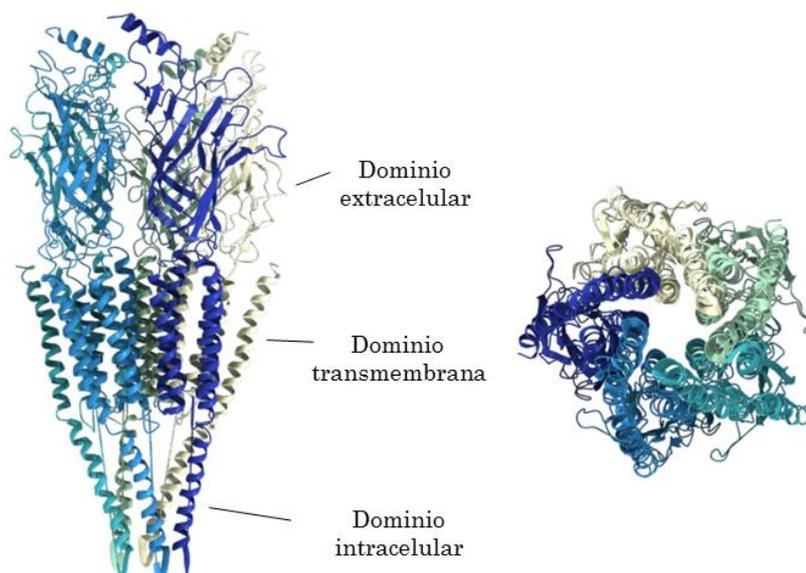
Dentro de la superfamilia de los LGIC se encuentra la familia de los receptores *Cys-loop*, llamados así dado que todas sus subunidades tienen en el dominio N-terminal un puente disulfuro entre dos cisteínas separadas por 13 aminoácidos formando precisamente el “*Cys-loop*” (Karlin, 2002; Thompson *et al.*, 2010; Bouzat, 2012). Esta familia incluye

canales catiónicos, como los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) y los receptores 5-HT<sub>3</sub> de serotonina; y canales aniónicos, como los activados por GABA (receptores GABA<sub>A</sub>) y los activados por glicina (Le Novère y Changeux, 2001; Sine y Engel, 2006; Bouzat *et al.*, 2018).

## - ESTRUCTURA

Todos los receptores *Cys-loop* son proteínas pentaméricas. Las 5 subunidades que los forman se organizan pseudo-simétricamente alrededor de un poro o canal central.

En estos receptores pueden distinguirse un dominio extracelular (ECD, del inglés *extracellular domain*), donde se encuentran los sitios de unión al agonista y/o antagonistas, un dominio transmembrana (TMD, del inglés *transmembrane domain*), que contiene el canal iónico y que se encuentra en extenso contacto con los lípidos de membrana, y un dominio pequeño intracelular (ICD, del inglés *intracellular domain*), que contiene distintos sitios de regulación y señalización intracelular (Figura 3). Además, la interfase (o región de acoplamiento) entre la región extracelular y la región transmembrana es esencial para el acoplamiento entre la unión del agonista y la apertura del canal (Bouzat *et al.*, 2004; Lee y Sine, 2005; Bartos *et al.*, 2009). Cada una de las 5 subunidades de los receptores *Cys-loop* contribuye a la formación de estos 3 dominios diferentes.

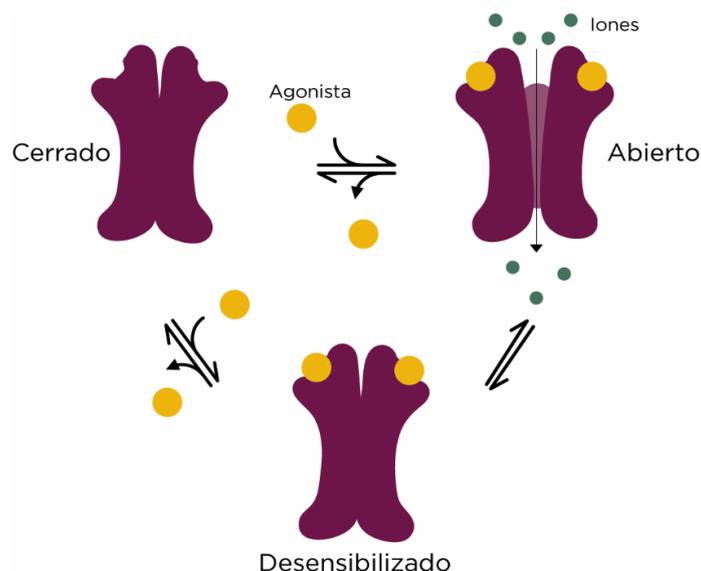


**Figura 3.** Modelo estructural general de los receptores *Cys-loop*. La estructura corresponde al receptor nicotínico  $\alpha 4\beta 2$  (PDB 5KXI) (Morales-Perez *et al.*, 2016). A la izquierda se observa al receptor en vista paralela a la membrana plasmática y a la derecha en vista perpendicular a la misma. En distintos colores se indican las distintas subunidades.

El dominio extracelular N-terminal de cada subunidad está formado por aproximadamente 210-220 aminoácidos y consiste en 10 cadenas  $\beta$  formando 2 láminas  $\beta$  que se pliegan para formar una estructura  $\beta$  sándwich característica. Para el dominio transmembrana, cada subunidad aporta 4 segmentos  $\alpha$ -hélice pequeños (15-20 aminoácidos) e hidrofóbicos, TM1-TM4, y dos segmentos de unión TM1-TM2 y TM2-TM3, *loops* pequeños e hidrofílicos. Los segmentos TM2 forman el poro transmembrana del canal. Además, cada subunidad posee un *loop* mayor (100-150 residuos) que conecta los segmentos TM3 y TM4, *loop* TM3-TM4, que en conjunto forman el dominio intracelular o citoplasmático. Por último, en cada subunidad existe un segmento extracelular hidrofílico más pequeño (4-28 aminoácidos) denominado C-terminal (Thompson *et al.*, 2010).

#### - ESTADOS CONFORMACIONALES Y ACTIVACIÓN

Los receptores pertenecientes a la familia *Cys-loop* pueden adoptar 3 estados conformacionales principales, además de otros varios estados intermedios (Figura 4). Inicialmente los receptores se encuentran en un estado cerrado (C). Luego de la unión del agonista, pasan a un estado abierto (O) de manera transitoria. La activación del canal involucra la unión del agonista, cambios conformacionales secuenciales y, por último, el gatillado o apertura del canal iónico (Chang *et al.*, 2009). En presencia continua del agonista se produce un proceso de desensibilización, en el cual, a pesar de que el receptor posee alta afinidad por el agonista, el poro del canal se encuentra cerrado (Zhang *et al.*, 2013). A este estado se lo conoce como estado desensibilizado (D).



**Figura 4.** Esquema básico de activación y desensibilización de los receptores *Cys-loop*.

En la conformación cerrada, el canal iónico está ocluido por residuos hidrofóbicos localizados cerca del centro del poro iónico, a la altura de la membrana plasmática. La unión del agonista produce cambios conformacionales que se inician justamente en los sitios de unión en el dominio extracelular y se propagan a través de la interfase entre los dominios extracelular y transmembrana. Esta región, de gran importancia, además de transmitir los cambios conformacionales originados en los sitios de unión al resto del receptor llevando a la apertura del poro del canal, también se encuentra involucrada en el tiempo de apertura del canal y la velocidad de desensibilización. De esta forma, esta región controla el comienzo y la duración de la respuesta sináptica (Bouzat, 2012). Los cambios propagados a través de la interfase se traducen finalmente en un movimiento de los segmentos TM2 que llevan al receptor al estado abierto: las hélices  $\alpha$  que conforman este segmento transmembrana rotan y se inclinan aumentando el diámetro del poro del canal permitiendo, de ese modo, el flujo de iones a través del mismo. Una exposición prolongada al agonista lleva al receptor a un estado desensibilizado, caracterizado por una alta afinidad por el agonista en la cual el poro del canal se encuentra en una conformación que no permite el paso de iones (Domville y Baenziger, 2018).

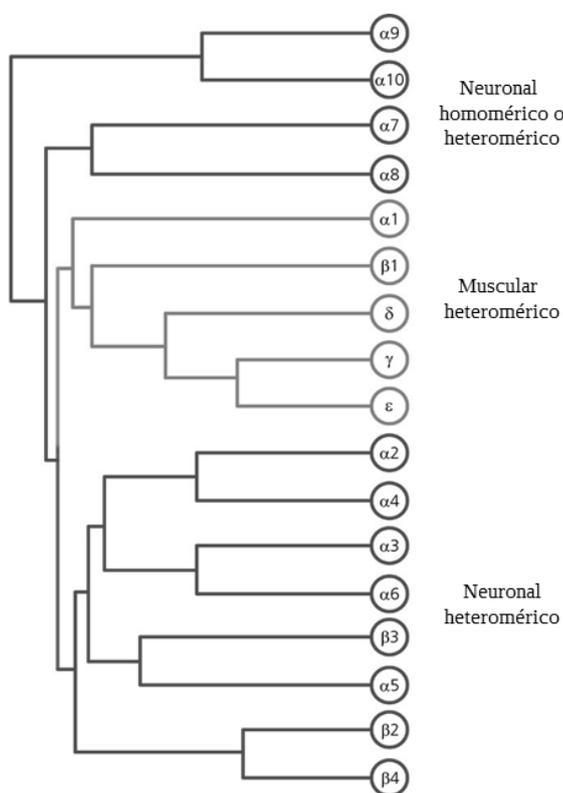
Factores que afecten la habilidad de estos receptores ya sea para la unión del agonista, para conducir iones, y/o para acoplar la unión del agonista a la apertura del canal, tienen la potencialidad de modular la respuesta sináptica que a través de ellos se origina (daCosta y Baenziger, 2009).

## 2.1. RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) pertenecen a la familia *Cys-loop* y están presentes en todo el reino animal, desde nematodos hasta humanos (Le Novère y Changeux, 1995). Estos se expresan en diversas regiones del sistema nervioso central y periférico, además de en otros tejidos no neuronales.

### - ESTRUCTURA

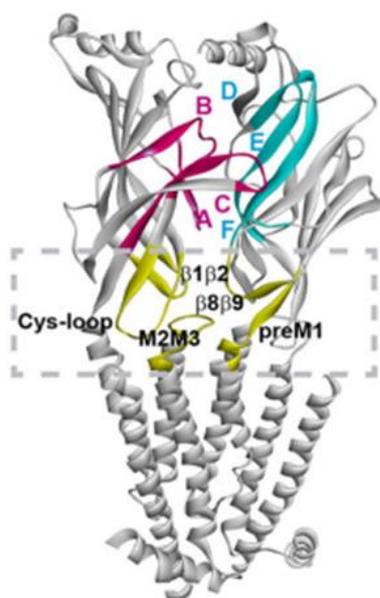
En vertebrados existen 17 subunidades diferentes (denominadas subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ) que se combinan para originar una gran variedad de receptores con distinta farmacología y localización (Le Novère *et al.*, 2002) (Figura 5).



**Figura 5.** Cladograma de las subunidades de nAChRs de vertebrados. Tomada de Bouzat *et al.*, 2019, adaptada de Le Novère *et al.*, 2002.

Las subunidades pueden ser idénticas y formar así receptores homoméricos, o diferentes y formar receptores heteroméricos (siempre deben contener por lo menos 2 subunidades  $\alpha$ ).

En la estructura de los nAChRs se distinguen los 3 dominios característicos de esta superfamilia de receptores. Los sitios de unión del agonista se encuentran en el dominio extracelular, en la interfase entre distintas subunidades. Estos sitios están formados por 6 *loops* distribuidos en dos caras; una cara principal (+), formada por aminoácidos de una subunidad  $\alpha$ , que contribuye al sitio de unión con los *loops* A (que corresponde al *loop*  $\beta 4\beta 5$ ), B (*loop*  $\beta 7\beta 8$ ) y C (*loop*  $\beta 9\beta 10$ ), y una cara complementaria (-), formada por aminoácidos de la subunidad adyacente (que puede ser  $\alpha$  o no  $\alpha$ ) que aporta los *loops* D, E y F (Brejc *et al.*, 2001) (Figura 6). Los *loops* mencionados agrupan residuos claves para la unión de ACh. En la cara principal, el *loop* A contiene los residuos W86 e Y93, el *loop* B los residuos W149 y G153, y el *loop* C los residuos Y190, C192, C193 e Y198. Con respecto a la cara complementaria, en el *loop* D se encuentran los residuos W55 y D57, en el *loop* E los residuos L109, R111, T117 y L119, y en el *loop* F los residuos D174 y E176.



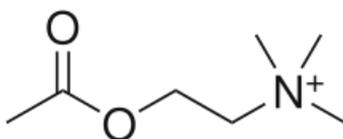
**Figura 6.** Subunidades adyacentes mostrando los *loops* que contribuyen al sitio de unión de la ACh y a la interfase o región de acoplamiento (dentro del recuadro). La estructura corresponde al receptor nicotínico  $\alpha 4\beta 2$  (PDB 5KXI) (Morales-Pérez *et al.*, 2016).

El dominio transmembrana está formado por cuatro hélices  $\alpha$  en cada subunidad, TM1-TM4. Las cinco hélices TM2 de las distintas subunidades forman el poro del canal iónico, originando una estructura en forma de “V” o embudo, que se ensancha desde la membrana hacia el extremo extracelular o vestíbulo del canal (Absalom *et al.*, 2009; Morales-perez *et al.*, 2016). En el centro de la membrana el poro posee un área de máxima constricción denominada compuerta, formada, principalmente, por residuos hidrofóbicos (Unwin, 2005; Bouzat, 2012). El resto de las hélices (TM1, TM3 y TM4) se ubican más

externamente, siendo TM4 la que presenta mayor contacto con los lípidos de la membrana plasmática (Barrantes *et al.*, 2009; Bouzat *et al.*, 2012).

#### - ACTIVACIÓN POR ACETILCOLINA

Los nAChRs responden al neurotransmisor acetilcolina (ACh) (Figura 7).



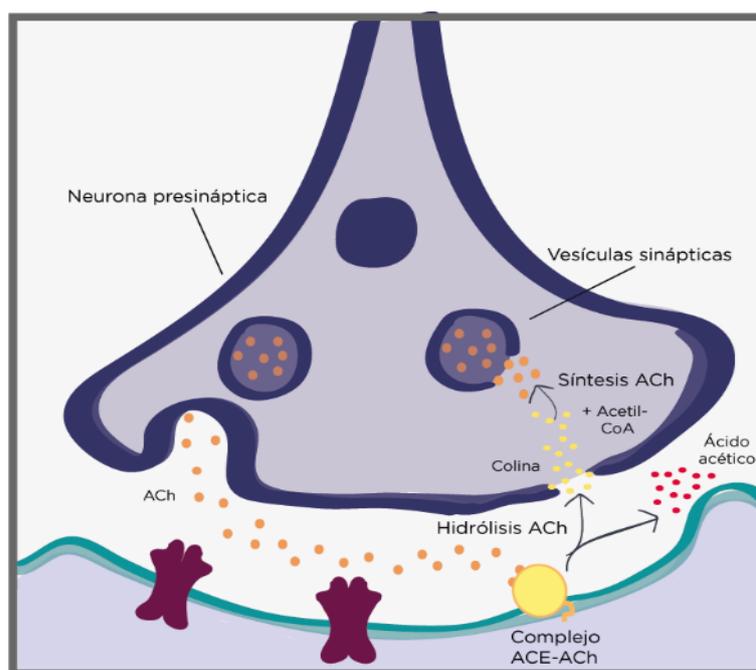
**Figura 7.** Estructura química de la ACh.

En 1921 Otto Loewi observó que el nervio vago liberaba una sustancia que disminuía la velocidad de los latidos de un preparado de corazón de rana y describió esta actividad como “transmisión humoral”. Experimentos posteriores demostraron que la sustancia liberada era la ACh y que sus efectos podían también observarse en otros tejidos. El papel de la ACh fue estudiado en un principio por Bernhard Katz, John Eccles y Stephen Kuffler, entre otros, quienes mediante métodos electrofisiológicos demostraron que la interacción de la ACh con un receptor de la membrana postsináptica provocaba un incremento en la conductancia de la membrana a cationes, produciéndose una despolarización de la membrana de la célula muscular, lo que constituía la señal inicial para la contracción muscular. En 1953 David Nachmansohn sugirió que el receptor postsináptico de la ACh podría ser una proteína que al unir el neurotransmisor sufriría un cambio conformacional que provocaría la formación de un canal para el paso de iones a través de la membrana, hipótesis que quedó luego ampliamente confirmada.

La ACh es el neurotransmisor más abundante en el organismo, presente tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. Es utilizada por las neuronas motoras de la médula espinal y, por lo tanto, es liberada en la unión neuromuscular en vertebrados. Además, es el principal neurotransmisor del sistema nervioso autónomo para todas las neuronas preganglionares y para las neuronas postganglionares parasimpáticas.

Las neuronas que sintetizan, almacenan y liberan ACh son llamadas neuronas colinérgicas. Cuando un potencial de acción llega a la neurona colinérgica presináptica produce la apertura de canales de calcio, lo que genera un flujo de iones calcio hacia el interior celular y lleva a la fusión de las vesículas citoplasmáticas, donde se encuentra

almacenada la ACh, con la membrana neuronal. La ACh es así liberada y se une a sus receptores específicos, los nAChRs, en la célula postsináptica. A partir de esta unión, el canal del receptor se abre durante unos pocos microsegundos (Maconochie *et al.* 1995; Chakrapani y Auerbach, 2005) y se produce un flujo de iones positivos, principalmente sodio, hacia el interior celular siguiendo el gradiente electroquímico existente. La apertura de varios canales a la vez genera la despolarización de la membrana de la célula postsináptica, lo que permite la generación de un potencial de acción. La concentración de ACh en la hendidura sináptica disminuye rápidamente (dentro de un rango de milisegundos) como resultado de la acción de la acetilcolinesterasa (ACE), enzima que degrada a la ACh en acetato y colina, siendo esta última recaptada por la célula presináptica para sintetizar nuevamente ACh. Además, las moléculas de ACh unidas al nAChR se disocian de sus sitios de unión, volviendo así el nAChR a su estado cerrado. Los eventos de apertura y cierre del canal son extremadamente rápidos, lo que permite una rápida iniciación y terminación de la respuesta postsináptica (Unwin, 2013) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema general de una sinapsis química colinérgica.

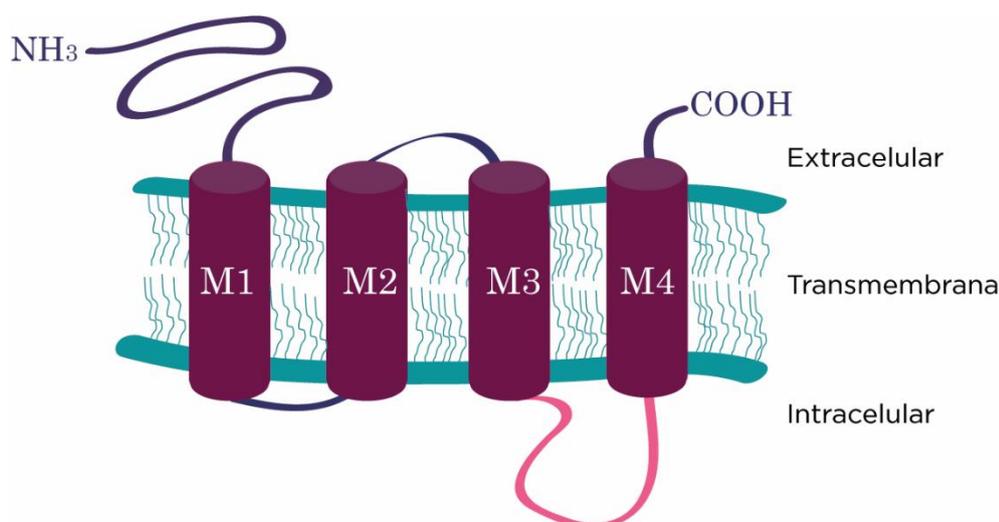
Las respuestas de los nAChRs a la presencia de ACh endógena están implicadas en un gran número de procesos fisiológicos y, debido a esto, una disrupción o alteración de las vías colinérgicas puede conducir a enfermedades o síntomas muy diversos a nivel de todo el organismo (Dani y Bertrand, 2007; Albuquerque *et al.*, 2009).

### 2.1.1. RECEPTOR NICOTÍNICO MUSCULAR

El receptor nicotínico de ACh muscular (nAChR muscular), perteneciente a la familia *Cys-loop*, media la transmisión neuromuscular en vertebrados (Edmonds *et al.*, 1995).

#### - ESTRUCTURA

El nAChR muscular está compuesto por 5 subunidades: 2 subunidades  $\alpha 1$ , una subunidad  $\beta 1$ , una subunidad  $\delta$  y una subunidad  $\gamma$  (si se trata de un receptor embrionario o de *Torpedo californica*) o  $\epsilon$  (si se trata de un receptor de adulto). Posee 2 sitios de unión a ACh que se ubican uno entre las subunidades  $\alpha$  y  $\delta$ , y el otro entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma/\epsilon$ . Como en todos los receptores *Cys-loop*, cada subunidad se encuentra conformada por una extensa porción extracelular (aproximadamente 200 aminoácidos) formada por láminas  $\beta$ , 4 segmentos hidrofóbicos transmembrana (TM1 a TM4) formando hélices  $\alpha$ , y una porción intracelular (Albuquerque *et al.*, 2009) (Figura 9).



**Figura 9.** Esquema de la estructura general de las subunidades del nAChR de los receptores *Cys-loop*.

Los segmentos transmembrana de cada subunidad se ubican de manera regular, formando tres anillos concéntricos (Barrantes, 2003, 2004). Los segmentos TM2 de cada subunidad delinean el canal iónico por donde pasan los cationes. Los segmentos TM1 y TM3 forman el anillo intermedio. Los segmentos TM4 de cada subunidad forman el anillo externo y son los que se encuentran en mayor contacto con los lípidos de la membrana.

#### - LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN

Los nAChRs musculares se encuentran formando agrupaciones de alta densidad, *clusters*, en la membrana de las células musculares (unión neuromuscular) y al hecho de

que se activen simultáneamente se debe el éxito de la contracción muscular. La unión neuromuscular está compuesta por la sección terminal del axón de una neurona motora, la hendidura sináptica, y la fibra muscular que la neurona motora inerva (Hughes *et al.*, 2006). La neurona motora presenta en las terminales presinápticas una gran cantidad de mitocondrias y vesículas que contienen ACh. La zona de la célula muscular que está en contacto con las terminales presinápticas se conoce como placa motora. En esta región la membrana plasmática presenta una serie de pliegues, en cuyas cavidades se ubican las enzimas ACE, mientras que en los picos se encuentran los nAChRs (Hughes *et al.*, 2006; Engel, 2008; Hurst *et al.*, 2012).

Varias sustancias que generan la agregación del nAChR en la placa neuromuscular fueron estudiadas tanto en cultivo de miotubos como *in vivo*, pero solo el proteoglicano agrina neural fue capaz de producir la agregación tanto del nAChR muscular como de otros componentes del aparato postsináptico muscular. La agrina neural es secretada por las neuronas motoras para direccionar la formación de la unión neuromuscular (McMahan, 1990; Gautam *et al.*, 1996; Zong *et al.*, 2012). La proteína receptora de agrina es la tirosina quinasa específica de músculo (MuSK) (Glass *et al.*, 1996) y la unión de la agrina neural a MuSK desencadena una cascada de señalización que termina en la activación de la proteína periférica rapsina (Piguet *et al.*, 2011). Esta proteína del músculo esquelético sería la responsable de la agregación del nAChR para formar los *clusters* de alta densidad (Ramarao y Cohen, 1998). A su vez, la agrina neural induce la polimerización de los filamentos de actina en los sitios donde ocurren los acúmulos de nAChR (Dai *et al.*, 2000), lo que permite que se produzca, luego, la inmovilización de la proteína receptora.

Debido a que este nAChR es un componente fundamental en la contracción muscular, su mal funcionamiento ha sido asociado a diversas enfermedades o trastornos neuromusculares, entre los que pueden mencionarse la *Miastenia gravis*, enfermedad neuromuscular autoinmune, o los síndromes miasténicos congénitos (Victor *et al.*, 1992; Lindstrom, 2002; Gilhus *et al.*, 2019), caracterizados por una alteración en la transmisión neuromuscular que produce grados variables de debilidad de los músculos del cuerpo.

#### - nAChR DE *T. californica* COMO MODELO DE ESTUDIO

A pesar de los avances obtenidos en la descripción electrofisiológica y farmacológica de la respuesta colinérgica, recién a mediados de los años 70 se pudo abordar el estudio bioquímico y estructural del receptor nicotínico. Los peces eléctricos de la familia de los *Torpedinidae* (*Torpedo californica*, *marmorata* y *nobiliana*, entre otros) fueron (y continúan siendo) de gran importancia para el estudio de los nAChRs. Estos peces poseen

un órgano eléctrico que puede generar potenciales de acción de 50 V con una intensidad de corriente de 50 A. Este órgano posee una estructura en forma de pilas de células llamadas electrocitos, células musculares que perdieron su capacidad de producir contracciones pero no su excitabilidad. Las membranas postsinápticas de las mismas se asemejan a las de la unión neuromuscular, organizadas en una serie de invaginaciones o láminas, análogas a los pliegues de las células musculares. El receptor se encuentra en gran concentración en los electrocitos, donde es aproximadamente 1000 veces más abundante que en el músculo estriado, y este hecho es lo que facilitó su aislamiento y purificación (Criado, 2011).

El hallazgo de la  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BTX), agonista competitivo del nAChR, permitió la purificación del receptor nicotínico del órgano eléctrico de *T. californica*. Los estudios bioquímicos demostraron que el receptor es un pentámero transmembrana conformado por las 5 subunidades ya mencionadas, que el sitio de unión de ACh y de otros agonistas y antagonistas reside principalmente en las subunidades  $\alpha$ , que una vez purificado es capaz de ensamblarse en membranas lipídicas artificiales y ser activado por agonistas, y que todas las subunidades contribuyen a la formación del poro iónico localizado en el centro de la molécula. En 1982, Numa y colaboradores publicaron la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  del receptor nicotínico de acetilcolina (Noda *et al.*, 1982). A esta siguieron las de las demás subunidades, tanto del órgano eléctrico de *T. californica* como de la placa motora de varios mamíferos, comprobándose que todas ellas eran homólogas y poseían la organización estructural ya mencionada. También se observó que este receptor nicotínico posee dos sitios de unión de ACh ligeramente distintos en su comportamiento farmacológico, un sitio en la interfase  $\alpha/\delta$  y otro en la interfase  $\alpha/\gamma$  (Criado, 2011).

Dadas las características mencionadas, el nAChR de *T. californica* es ampliamente utilizado como modelo de estudio del nAChR humano y la gran cantidad de información obtenida a partir de su estudio puede ser extrapolada a toda la familia de receptores en humanos (Unwin, 2013).

### **2.1.2. RECEPTOR NICOTÍNICO $\alpha 7$ NEURONAL**

En las distintas áreas del cerebro se encuentran diferentes receptores nicotínicos con variadas propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. El receptor neuronal predominante en el cerebro y principal responsable de los sitios de alta afinidad para nicotina es el formado por subunidades  $\alpha 4$  y  $\beta 2$ . En cambio, las subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  son las que predominan en el sistema nervioso periférico, a veces acompañadas de la

subunidad  $\alpha 5$ . En algunos tejidos sensoriales, como las células del oído interno, se encuentra la combinación  $\alpha 9 \alpha 10$ , de localización muy restringida (Elgoyhen *et al.*, 1994). Todos estos receptores neuronales tienen en común el hecho de que no se bloquean con la  $\alpha$ -BTX (Criado *et al.*, 2011).

Dentro de los receptores neuronales, el nAChR  $\alpha 7$  ha sido ampliamente estudiado debido a sus características particulares, a su amplia distribución en el sistema nervioso y a su gran implicancia en diversos desórdenes neurológicos e inflamatorios (Taly y Changeux, 2008; Wallace y Porter, 2011; Lendvai *et al.*, 2013; Uteshev, 2014; Dineley *et al.*, 2015).

#### - ESTRUCTURA

El nAChR  $\alpha 7$  es un receptor homomérico formado por 5 subunidades  $\alpha 7$ , cada una con la estructura característica descrita anteriormente para los receptores nicotínicos y los receptores *Cys-loop* en general. Al ser un homopentámero formado por todas subunidades de tipo  $\alpha$ , este receptor posee 5 sitios de unión a ACh.

Dentro del grupo de los nAChRs, el nAChR  $\alpha 7$  posee características particulares y distintivas entre las que se pueden mencionar: su alta permeabilidad al calcio (Séguéla *et al.*, 1993), su afinidad por la  $\alpha$ -BTX (característica que, a diferencia del resto de los receptores neuronales, comparte con el receptor muscular) y por el alcaloide vegetal metilcaconitina (Couturier *et al.*, 1990; Palma *et al.*, 1996) y una baja probabilidad de apertura sumada a una rápida velocidad de desensibilización (Lendvai *et al.*, 2013).

#### - LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN

El nAChR  $\alpha 7$  neuronal se encuentra expresado mayoritariamente en las regiones cerebrales implicadas en la función cognitiva y la memoria, como el hipocampo, la corteza y varias regiones subcorticales (Lendvai *et al.*, 2013). Estos receptores están implicados en la función cognitiva, procesos sensoriales, atención y memoria, entre otras, y varios trabajos sostienen que la potenciación de la actividad de  $\alpha 7$  mejora la atención, el rendimiento cognitivo y la resistencia al daño neuronal (Uteshev, 2014).

Localizado presinápticamente en terminales GABAérgicas y glutamatérgicas, sobre todo en el hipocampo, modula la liberación de varios neurotransmisores (GABA, glutamato, dopamina y norepinefrina) y los niveles de calcio intracelular (Broide y Leslie, 1999). Postsinápticamente posibilita la transmisión sináptica rápida. La activación de  $\alpha 7$

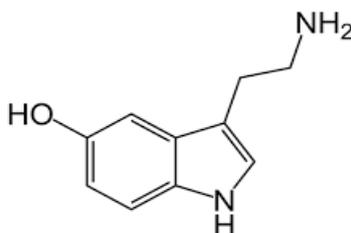
potencia la transmisión sináptica y afecta la potenciación a largo plazo (Lendvai *et al.*, 2013).

La expresión de  $\alpha 7$  es beneficiosa para el sistema nervioso dado que una activación moderada de estos receptores aumenta la resistencia celular al daño cerebral, lo que ha sido demostrado en experimentos *in vivo* y en modelos *ex vivo* de demencias, isquemia cerebral y daño cerebral traumático (Lendvai *et al.*, 2013). En la enfermedad de Alzheimer (EA) y en otros desórdenes neurodegenerativos ha sido reportada una significativa reducción de  $\alpha 7$  en la región del hipocampo (Guan *et al.*, 2000; Schaaf, 2014; Dineley *et al.*, 2015). Los estudios sobre plasticidad neuronal *in vitro* y sobre efectos cognitivos *in vivo* apoyan la idea de que la potenciación de  $\alpha 7$  podría resultar una forma efectiva de terapia contra el deterioro cognitivo (Lendvai *et al.*, 2013).

Dadas las propiedades únicas de activación, la alta permeabilidad al calcio, la distribución ubicua y abundante en el SNC y el rol en una gran variedad de enfermedades neurológicas, psiquiátricas e inflamatorias, el nAChR  $\alpha 7$  se presenta como un blanco farmacológico emergente de gran importancia (Corradi y Bouzat, 2016).

## 2.2. RECEPTORES DE SEROTONINA

La familia de receptores de serotonina, 5-hidroxitriptamina (5-HT, una amina derivada del metabolismo del triptófano) (Figura 10), puede dividirse en dos grandes grupos que difieren en el mecanismo por el cual transmiten su señal al interior celular. Uno de los grupos pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G y el otro está compuesto por receptores que pertenecen a la familia de los LGIC. Ambos grupos conforman una gran familia de receptores que a su vez se divide en 7 subgrupos o clases de receptores (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>). Dentro de esta familiar, los receptores 5-HT de tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>) son canales iónicos activados por ligando pertenecientes a la familia de los receptores *Cys-loop* (Lester *et al.*, 2004; Nys *et al.*, 2013).



**Figura 10.** Estructura química de la serotonina.

## - ESTRUCTURA

Los receptores 5-HT<sub>3</sub>, al igual que el resto de los receptores *Cys-loop*, son proteínas pentaméricas. Hasta el momento han sido identificadas 5 subunidades de este receptor (5HT<sub>3</sub>A-E) en humanos (Niesler *et al.*, 2007, 2011). La subunidad 5HT<sub>3</sub>A es la única capaz de formar receptores homoméricos (5-HT<sub>3</sub>A) (Maricq *et al.*, 1991; Hanna *et al.*, 2000; Mott *et al.*, 2001). Las subunidades 5HT<sub>3</sub>B-E forman receptores heteroméricos al ensamblarse con la subunidad 5HT<sub>3</sub>A, siendo los receptores 5HT<sub>3</sub>AB los más estudiados hasta el momento (Davies *et al.*, 1999; Brady *et al.*, 2001; Niesler *et al.*, 2007,2011; Corradi *et al.*, 2015). El receptor homomérico 5-HT<sub>3</sub>A forma canales que poseen una muy baja conductancia (<1 pS), lo que imposibilita su estudio por medio de registros de canal único. Cuando las subunidades A y B se expresan en conjunto, los receptores heteroméricos presentan una mayor conductancia, detectable a nivel de canal único (9-17 pS) (Hanna *et al.*, 2000; Kelley *et al.*, 2003).

Los receptores homoméricos 5-HT<sub>3</sub>A presentan 5 sitios de unión a serotonina, aunque se cree que con la ocupación de 2-3 de los sitios se alcanzaría la activación máxima (Corradi *et al.*, 2015).

Estos receptores presentan un 20-30 % de identidad de secuencia aminoacídica y una estructura secundaria y terciaria similar a la de los otros miembros de la familia *Cys-loop*, como los nAChRs (Maricq *et al.*, 1991). Los 3 dominios característicos pueden ser distinguidos: una región extracelular que contiene los sitios de unión a los agonistas y/o antagonistas, una región transmembrana formada por los 4 segmentos típicos de cada subunidad (TM1-TM4), y una región intracelular formada por el *loop* citoplasmático que conecta los segmentos TM3-TM4. Por medio de la construcción de subunidades quiméricas A-B se demostró que tres residuos arginina presentes en el *loop* intracelular TM3-TM4 son componentes fundamentales en la determinación de la conductancia del receptor homomérico 5-HT<sub>3</sub>A. Estas argininas no se encuentran en la subunidad B (Kelley *et al.*, 2003), encontrando en las posiciones equivalentes para la subunidad humana residuos glutamina (Q), ácido aspártico (D) y alanina (A) (Kelley *et al.*, 2003; Bouzat *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2005; Bouzat *et al.*, 2008; Corradi *et al.*, 2009).

## - ACTIVACIÓN POR SEROTONINA

La molécula de 5-HT se aisló inicialmente de extractos de intestino, recibiendo el nombre de enteramina. Poco después, en 1947, fue identificada como un potente

vasoconstrictor presente en el suero sanguíneo, de donde obtuvo el nombre con el que se la conoce actualmente (del latín *serum*= suero, y *tonos* = tensión).

A las neuronas que sintetizan, almacenan y liberan 5-HT se las conoce como neuronas serotoninérgicas. La 5-HT ejerce su acción como neurotransmisor en sinapsis excitatorias. Su unión a los receptores 5-HT<sub>3</sub> en sitios localizados en el dominio extracelular en la interfase entre subunidades adyacentes (Nys *et al.*, 2013) provoca la apertura del canal y el ingreso rápido de iones positivos a la célula (Derkach *et al.*, 1989).

#### - LOCALIZACIÓN Y FUNCION

La 5-HT puede generar su acción sobre una amplia familia de receptores distribuidos en diversos tejidos. Sus receptores se encuentran en sistema nervioso central y periférico, así como también en un número elevado de tejidos no neuronales, como intestino, sistema cardiovascular y sangre. En el sistema nervioso central estos receptores se encuentran en varias regiones, incluyendo la capa de células piramidales CA1 del hipocampo, el núcleo dorsal motor del tracto solitario y el área postrema. A este nivel, intervienen en la modulación del dolor y en una serie de procesos como la memoria, conducta, adicción, control de las emociones, sistema de recompensa y funciones cognitivas. Además, han sido relacionados con una gran variedad de desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia y con trastornos neurodegenerativos como la EA (Lummis, 2012; Engel *et al.*, 2013; Thompson, 2013).

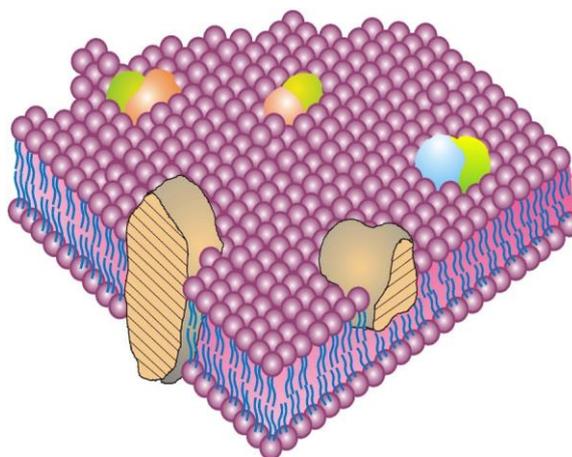
Estos receptores se localizan tanto en regiones pre como postsinápticas, donde modulan la liberación de otros neurotransmisores como dopamina, colecistoquinina, GABA, sustancia P y ACh (Van Hooft y Vijverberg, 2000; Thompson y Lummis, 2007). Además, se encuentran expresados en ganglios periféricos, donde se cree que serían responsables de la modulación de la respuesta al dolor y controlarían reflejos tanto del sistema entérico como cardiovascular (Hanna *et al.*, 2000).

De esta manera, los receptores de 5-HT están implicados en funciones muy diversas. Como consecuencia de esto se los considera blancos importantes para el descubrimiento y desarrollo de fármacos terapéuticos. Su intervención en el control de la liberación de neurotransmisores les da especial importancia en el tratamiento de disfunciones a nivel central, tales como ansiedad, esquizofrenia, desórdenes del comportamiento, desórdenes alimenticios (bulimia y anorexia) y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, entre otras (Barnes y Sharp, 1999).

### 3. MEMBRANA PLASMÁTICA

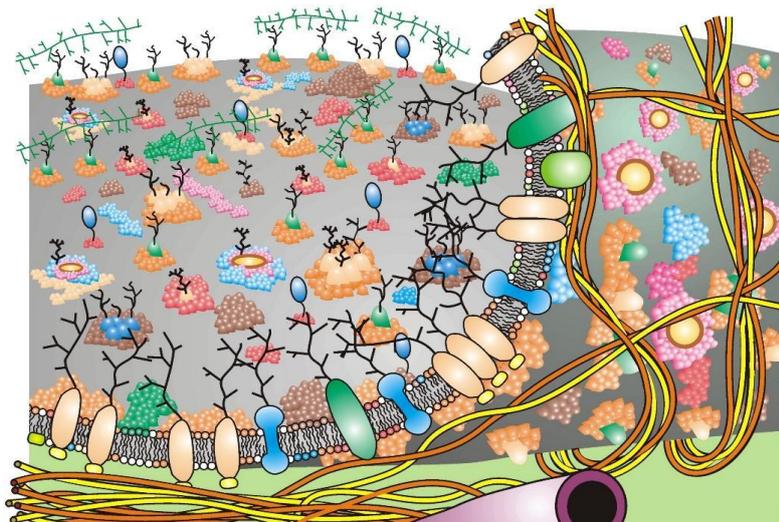
La membrana celular o plasmática, formada por lípidos, proteínas y, en menor medida, glúcidos, es la barrera física que separa el medio celular interno del medio externo.

Varios modelos de membrana fueron postulados hasta que Singer y Nicolson propusieron el modelo de mosaico-fluido (Singer y Nicolson, 1972) (Figura 11). Este modelo presenta a la membrana plasmática como una bicapa plana, prácticamente homogénea, de lípidos en fase líquido-cristalina, donde las cadenas lipídicas están principalmente desordenadas. Las dos hemicapas que la forman son diferentes en cuanto a la composición, estructura y distribución de las moléculas que presentan. Las proteínas, que se encuentran en una relación proteínas:lípidos de 1,5:4, pueden interactuar con la bicapa lipídica de dos maneras diferentes: asociándose a las cabezas polares de los lípidos (proteínas extrínsecas o periféricas) o asociándose a la matriz hidrofóbica (proteínas intrínsecas o integrales). Sin embargo, en este modelo de membrana los lípidos y las proteínas no interactúan fuertemente, sino que se comportan como entidades independientes (Figura 11). Según este modelo, de membrana fluida, las moléculas que la componen tienen dos posibilidades de movimiento: rotacional alrededor de un eje perpendicular al plano de la membrana o translacional a lo largo del plano de la membrana.



**Figura 11.** Modelo de mosaico-fluido de la membrana propuesto e por Singer y Nicolson en 1972. La figura representa proteínas integrales distribuidas aleatoriamente en una bicapa lipídica fluida. Tomada de Nicolson, 2014.

El modelo postulado por Singer y Nicolson tuvo una gran aceptación y aún se sigue considerando como modelo de membrana, aunque con ciertas modificaciones (Nicolson, 2014) (Figura 12). Hoy en día se sabe que las membranas biológicas pueden encontrarse en diferentes fases además de la postulada inicialmente. Existen otras fases laminares como las líquido-ordenadas (Lo) (donde las cadenas acílicas de los fosfolípidos presentan un mayor grado de ordenamiento por lo que su fluidez se reduce considerablemente), así como también fases no laminares, como las romboédricas, tetragonales, hexagonales invertidas y cúbicas, todas ellas con funciones fisiológicas importantes y diferentes. Las membranas son generalmente curvas y su estructura es modulada dinámicamente por las características de los lípidos y proteínas que las componen. Una gran cantidad de proteínas forman parte de la membrana, no solo proteínas extrínsecas e intrínsecas, sino también proteínas asociadas que pueden unirse temporalmente a una u otra superficie de la bicapa lipídica cumpliendo diferentes funciones. Debido a que los lípidos, las proteínas y demás moléculas que las componen son diferentes en ambas hemicapas, las membranas plasmáticas son estructuras asimétricas. En cuanto a los lípidos, para mantener esta asimetría es necesaria la presencia de transportadores lipídicos o bien los movimientos transbicapa (*flip-flop*) espontáneos de los lípidos (Quinn, 2002; Daleke, 2003; van Meer, 2011), movimiento que se suma a los rotacionales y traslacionales propuestos inicialmente. Esta asimetría es esencial para las células, y una disrupción en la misma está asociada, generalmente, a condiciones patológicas. La membrana plasmática es heterogénea tanto en su composición como en su organización. La diversidad de las moléculas que la componen, la relación preferencial entre ciertos lípidos y proteínas, la falta de concordancia (o *mismatch*) entre el largo de los segmentos transmembrana hidrofóbicos de ciertas proteínas y el largo de las cadenas lipídicas, el anclaje de proteínas integrales al citoesqueleto, y la escasa miscibilidad de ciertos lípidos, entre otras, dan como resultado una gran variedad de dominios laterales y transbicapa con distintas implicancias funcionales (Figura 12). Un ejemplo de estos dominios está dado por la agregación de ciertos lípidos de la membrana en dominios transitorios relativamente ordenados en la hemicapa externa, a los que se conoce como balsas lipídicas o *rafts* (Levental y Veatch, 2016; Sezgin *et al.*, 2017).



**Figura 12.** Actualización del modelo de mosaico-fluido. Se muestran distintos componentes de la membrana y del citoesqueleto, y estructuras extracelulares asociadas. Distintas proteínas integrales, glicoproteínas, lípidos y oligosacáridos están representados por diferentes colores. La región de la membrana que ha sido extraída muestra las restricciones laterales de algunas proteínas debidas a su interacción con el citoesqueleto. También están representados otros mecanismos de restricción, tales como los dominios lipídicos y la formación de complejos proteicos. Tomada de Nicolson, 2014.

#### - RAFTS DE MEMBRANA

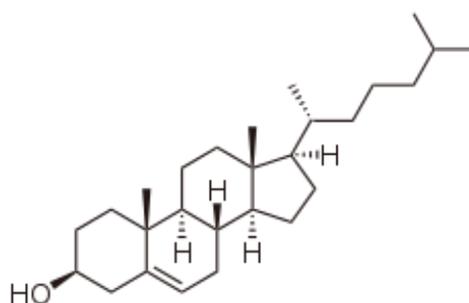
Los *rafts* son uno de los tipos de dominios de membrana existentes. Estos dominios pequeños (100-200 nm), heterogéneos y altamente dinámicos se encuentran presentes en las membranas de células eucariotas. Son microdominios ordenados enriquecidos fundamentalmente en Col y esfingomiélin (SM) (Simons y Ikonen, 1997; Lingwood y Simons, 2010). Para que ocurra la formación de estos dominios, la membrana debe estar compuesta por al menos tres tipos de lípidos: Col, una molécula que interactúe de manera estrecha con el Col, como la SM, y ácidos grasos insaturados (Feller, 2008). La presencia de fosfolípidos poliinsaturados hace que estos dominios estén mejor definidos (Levental *et al.* 2016). La membrana que rodea a los dominios *raft* es más fluida, debido a que está compuesta mayoritariamente por fosfolípidos con cadenas acílicas insaturadas.

Los *rafts* son considerados plataformas lipídicas funcionales insertas en la membrana que llevarían a la segregación de algunas proteínas, presumiblemente con el objetivo de hacer ciertos procesos de transducción de señales más eficientes. Se han descrito diversas proteínas que pueden ser selectivamente incluidas o excluidas de los mismos (Simons y Ikonen, 1997; Simons y Toomre 2000), siendo este el principio fundamental por el cual los *rafts* ejercerían sus funciones diferenciales. Además, los *rafts*

pueden coalescer o fusionarse mediante distintas interacciones, y formar así una “plataforma” de mayor tamaño permitiendo de esa manera a las distintas proteínas concentrarse e interactuar en mayor medida, y generar la activación de distintas cascadas de señalización. Debido a estas propiedades, los *rafts* de membrana tienen un rol central en la regulación de diversos procesos celulares (Simons y Toomre, 2000; Hancock, 2006; Lingwood y Simons 2010; Simons y Gerl 2010; Diaz-Rohrer *et al.*, 2014).

La existencia de los *rafts* ha sido estudiada en varios tipos de membranas modelo, tales como bicapas, monocapas, vesículas unilamelares gigantes (GUVs) y vesículas gigantes de membrana plasmática (GPMVs) (Baumgart *et al.*, 2007). El modelo que actualmente explica los principios físicos y químicos que subyacen a la formación de *rafts* es la coexistencia de dominios líquido-ordenados (Lo, análogos a los *rafts* pero referido a sistemas modelo) y líquido-desordenados (Ld, o *no-raft*). Una fase Lo presenta las cadenas lipídicas extendidas y ordenadas, lo que le otorga a la membrana una mayor rigidez y grosor, mientras que en una fase Ld las cadenas están altamente desordenadas y presentan una mayor movilidad, otorgándole a la membrana una mayor fluidez (Simons y Ikonen, 1997; London, 2005; Sonnino y Prinetti, 2013).

Uno de los componentes esenciales de los *rafts* es el Col, el cual se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas causando una disminución de su movilidad y una mayor compactación de la bicapa lipídica. El Col (3-hidroxi-5,6 colesteno) es un esteroide de 27 átomos de carbono cuyo grupo hidroxilo adopta la configuración  $\beta$ . En esta molécula se puede distinguir una cabeza polar, constituida por el grupo hidroxilo, y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos (Figura 13).



**Figura 13.** Estructura química del colesterol.

Las moléculas de Col tienen tendencia a formar estructuras laterales definidas (Chong *et al.*, 2009), evitando el contacto entre ellas y formando un arreglo simétrico de tres moléculas de Col cercanas entre sí (Martínez-Seara *et al.*, 2010). Este arreglo se genera espontáneamente en presencia de proporciones de Col mayores a 10 mol % y es lo que determina la capacidad de este lípido para formar los dominios *rafts*. Fritzsching y colaboradores demostraron que existe una interacción preferencial entre el Col y la SM en un amplio rango de concentraciones de Col y temperatura (Fritzsching *et al.*, 2013). Esta interacción favorable se explica a través del efecto paraguas (*Umbrella effect*), donde el Col, molécula apolar, depende de la cobertura de la cabeza polar de la SM (o del fosfolípido presente) para evitar la energía libre desfavorable que se produce al interactuar con el agua (Huang y Feigenson, 1999; Lingwood y Simons, 2010). La estructura de la cadena acíclica de la SM es muy importante para su interacción con el Col, ya que permite la existencia de fuerzas de Van der Waals entre estos lípidos, y, además, afecta la profundidad a la cual el Col se ubica dentro de la membrana (Björkbom *et al.*, 2011).

El Col es un componente mayoritario de las membranas de células eucariotas, donde modula tanto su fluidez como su grosor. Este lípido cumple un rol fundamental en la organización, dinámica, permeabilidad y función de las mismas (Liscum y Underwood, 1995; Schroeder *et al.*, 1996; Simons y Ikonen, 2000). Además, un gran número de proteínas, entre las que se pueden mencionar canales iónicos, transportadores y péptidos, se ven afectadas o son moduladas por su interacción con el Col.

#### **4. INTERACCIÓN LÍPIDOS-RECEPTOR NICOTÍNICO**

Dado el carácter transmembrana de los nAChRs es bien conocido que para su correcto funcionamiento, como así también para su biosíntesis, para el montaje de sus subunidades y para su transporte desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi y a la superficie celular, son fundamentales las propiedades o características de los lípidos de la membrana en la que se encuentran embebidos (Barrantes, 2004; daCosta *et al.*, 2004; Pediconi, *et al.*, 2004; Baier y Barrantes, 2007; Baenziger *et al.*, 2015). A su vez, se ha demostrado que el nAChR ejerce una marcada influencia sobre los lípidos de su entorno (Marsh y Barrantes, 1978; Jones y McNamee, 1988; Antollini *et al.*, 1996; Antollini y Barrantes, 1998; Mantipragada *et al.*, 2003; Antollini *et al.*, 2005; Hamouda *et al.*, 2006; Fernández Nievas *et al.*, 2008).

Distintos lípidos influyen la actividad del nAChR afectando tanto su función como su organización en la membrana. Dado que los lípidos cambian en respuesta al

envejecimiento y a distintas enfermedades neurodegenerativas (Yadav y Tiwari, 2014), y además varían en los distintos tejidos, es de suma importancia entender cómo los cambios en el entorno lipídico del nAChR generan un impacto en su estructura y actividad. Las interacciones entre los lípidos y el nAChR tienen una gran relevancia ya que incluso sutiles cambios en la actividad de los nAChRs causan grandes efectos en la biología humana (Schaaf, 2014).

#### - ENTORNO LIPÍDICO DEL nAChR

La capacidad del nAChR de experimentar los cambios conformacionales que se producen luego de la unión del agonista y que llevan a la apertura del canal es dependiente de su entorno lipídico (Baenziger *et al.*, 2015). Desde los primeros estudios realizados sobre este tema se puso de manifiesto la importancia de los lípidos para la función de los nAChRs (Briley y Changeux, 1978; Epstein y Racker, 1978; Dalziel *et al.*, 1980; Criado *et al.*, 1982 a,b; Fong y McNamee, 1986). Distintos estudios definieron un rol esencial del Col y los lípidos aniónicos en la función del nAChR, postulando que, en ausencia de estos lípidos, el nAChR permanece inactivo (Criado *et al.*, 1984; Fong y McNamee, 1986; Antollini *et al.*, 1996; daCosta y Baenziger, 2009; Baenziger *et al.*, 2017). Posteriormente se demostró que tanto el Col como los lípidos aniónicos mejoran la función del nAChR, aunque ninguno es absolutamente esencial (Baenziger *et al.*, 2000; Sturgeon y Baenziger, 2010; daCosta *et al.*, 2013). Estos lípidos afectan la función de los nAChRs, ya sea al estabilizar distintas fracciones de los mismos en conformaciones activables o no activables, o controlando las transiciones entre los distintos estados (daCosta *et al.*, 2009; daCosta *et al.*, 2013). Los mecanismos moleculares, sin embargo, aún no se conocen en su totalidad (Baenziger *et al.*, 2015). daCosta y Baenziger (2009) demostraron que la inactivación del nAChR observada en ausencia de estos lípidos no está relacionada a un proceso de desensibilización típico, sino a una nueva conformación “desacoplada” que adopta el nAChR en esas condiciones. En esta conformación el nAChR es capaz de unir al agonista con una alta afinidad, pero no de producir los cambios conformacionales que ocurren debido a ello. El microentorno lipídico del dominio transmembrana del nAChR influye particularmente en la comunicación entre el sitio de unión del agonista y el poro del canal (daCosta y Baenziger, 2009).

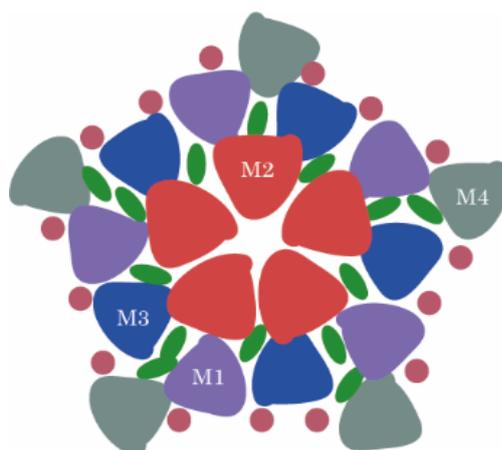
Marsh y Barrantes (1978) describieron una región de lípidos inmovilizados con características particulares que circunda al nAChR muscular (Marsh y Barrantes, 1978). Trabajando con nAChR de *T. californica* reconstituido, Jones y McNamee (1988) distinguieron 2 poblaciones de lípidos diferentes en la interfase nAChR-lípidos: lípidos no

anulares y lípidos anulares (Jones y McNamee, 1988). Los lípidos no anulares están en estrecho contacto con la proteína y, asociados a sitios de unión de la misma, su tasa de recambio con el resto de los lípidos de la membrana es muy baja. Los lípidos anulares, en cambio, interactúan con la proteína de una manera menos específica, y presentan una alta tasa de recambio con el resto de los lípidos de la membrana (Lee, 2003). La identidad de estos sitios se considera un aspecto crucial para la funcionalidad del nAChR. En sistemas nativos se pudieron identificar también sitios anulares y no anulares, lo que confirma que las características biofísicas que los lípidos ubicados en las zonas de la interfase lípido-nAChR le otorgan a la membrana tendrían una relevancia en cuanto a la función y estabilidad del receptor (Antollini y Barrantes, 1998).

Dos lípidos anulares de particular importancia para el nAChR son los lípidos aniónicos, ya mencionados, y la SM. La SM presenta una afinidad moderada por el nAChR, sin embargo, es de gran importancia para la estabilidad del mismo en la membrana (Bonini *et al.*, 2002). Una disminución de la SM afecta la eficiencia del ensamblado del nAChR y su transporte hacia la membrana plasmática (Roccamo *et al.*, 1999; Baier y Barrantes, 2007). Por otro lado, la SM es importante para el mantenimiento de la asimetría de la membrana y es uno de los componentes esenciales de los *rafts*, dos aspectos que tienen un alto impacto en el nAChR (Perillo *et al.*, 2016).

Debido a la abundancia del Col en las membranas neuronales y a su importancia en la salud e implicancia en distintas enfermedades en el humano, una gran cantidad de investigaciones se han enfocado en el estudio de los efectos de este lípido sobre la función del nAChR. Como lípido anular, y en el resto de la membrana, juega un papel importante condicionando las propiedades físicas del entorno, fundamentalmente debido a su partición en dominios *rafts*, y también en el mantenimiento de la asimetría de la membrana. Como lípido no anular, la existencia de sitios alostéricos de unión en el nAChR muscular fue postulada y demostrada (Jones y McNamee, 1988; Narayanaswami y McNamee, 1993; Antollini y Barrantes, 1998; Addona *et al.*, 1998). Corbin y colaboradores (1998) propusieron que el sitio de unión para el Col estaría localizado en la interfase nAChR-lípido, en contacto con las regiones TM4 y TM1 de la subunidad  $\alpha$ , y TM4 de la subunidad  $\gamma$  (Corbin *et al.*, 1998). Otros estudios identificaron interacciones del Col con los segmentos transmembrana TM1, TM3 y TM4 de cada subunidad (Hamouda *et al.*, 2006). Narayanaswami y McNamee (1993), trabajando con membranas reconstituidas de *T. californica*, identificaron sitios accesibles al Col pero no a los fosfolípidos. Mediante estudios de modelado, Brannigan (2008) identificó 3 sitios de unión al Col por cada subunidad: 2 dentro de cada subunidad, que evitarían el colapso de la proteína, y 1 en la

interfase entre subunidades, que mejoraría la estabilidad de la misma en la membrana. Hasta ese momento se especulaba que esos sitios estaban ocupados por moléculas de agua y se demostró, por simulaciones de dinámica molecular, que si esos sitios se llenan con agua la estructura de la proteína colapsa. La unión del Col en esos sitios facilitaría las interacciones entre la región transmembrana y la extracelular (Brannigan *et al.*, 2008) (Figura 14). En adición a esto, estudios de bioinformática pusieron de manifiesto la existencia de motivos de aminoácidos específicos para el reconocimiento de Col, motivos CRAC (*Cholesterol recognition amino acid consensus*), en el nAChR, que facilitarían la incorporación de los mismos a dominios ricos en Col. Además, se identificó un motivo CRAC invertido, denominado CARC, adyacente a uno de los sitios de unión a Col propuestos (Baier *et al.*, 2011; Fantini *et al.*, 2016), que exhibe una mayor afinidad por el Col (Fantini *et al.*, 2016).



**Figura 14.** Esquema de una vista desde arriba de los segmentos transmembrana del nAChR mostrando los sitios potenciales de unión al colesterol, tanto entre las hélices  $\alpha$  (óvalos verdes) como en la interfase lípidos-nAChR (círculos rosados). Tomada y adaptada de Baenziger, 2017 adaptada de Brannigan *et al.*, 2008.

Si bien estos estudios demostrarían la importancia de la unión del Col al nAChR, otros estudios demostraron que otros lípidos (tales como diacilglicerol,  $\alpha$ -tocoferol, coenzima Q y vitaminas D3 y K1, así como distintos análogos del Col) son capaces de reemplazar al Col y promover la función del receptor (Addona *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 1996; Sunshine y McNamee, 1992; Addona *et al.*, 1998). Un estudio reciente basado en simulaciones de dinámica molecular en el que se utilizó la estructura  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  del receptor de *T. californica* (PDB 2BG9) (Sharp *et al.*, 2019) demostró que las cadenas de los ácidos

grasos poliinsaturados (PUFAs, *poly-unsaturated fatty acids*) son capaces de desplazar al Col de los sitios anulares y no anulares en el nAChR.

A través de los años se han producido distintos avances que fueron modificando la interpretación de las interacciones entre el Col y los nAChRs. Resultados de distintas investigaciones presentan a veces interpretaciones contradictorias en cuanto a la relación entre el Col y el nAChR. Se ha indicado que tanto un enriquecimiento (Dalziel *et al.*, 1980; Criado *et al.*, 1982; Ochoa *et al.*, 1983) como una depleción (Santiago *et al.*, 2001) de Col producen un aumento de la función de este receptor. Además, se ha postulado que el Col aumenta la agregación del nAChR (Zhu *et al.*, 2006; Barrantes 2007; Pato *et al.*, 2008) e interactúa directamente con el mismo (Leibel 1987; Jones y McNamee 1998), pero que no necesariamente el nAChR particiona en dominios ricos en Col (Bermudez *et al.*, 2010). Algunas de estas aparentes contradicciones podrían explicarse mediante la competencia entre el Col y otros lípidos presentes en membranas nativas.

Los requerimientos lipídicos del nAChR en membranas modelo podrían no reflejar exactamente los requerimientos del nAChR en membranas biológicas. Además de presentar dominios *raft*, las membranas biológicas presentan una distribución desigual de los lípidos en ambas hemicapas, es decir, son asimétricas (Barrantes, 2004; Perillo *et al.*, 2016). Los niveles de un lípido particular requeridos para afectar la función del nAChR en una membrana reconstituida simple y homogénea no necesariamente son los mismos que los niveles del mismo lípido requeridos en una membrana biológica, donde la distribución lipídica y la heterogeneidad podrían tener otro efecto.

#### - El nAChR EN LA MEMBRANA

Distintos lípidos regulan la actividad de los nAChRs influyendo no solo en su función sino también en su organización y estabilidad en la membrana. La agregación de los nAChRs en la membrana plasmática es dependiente de los *rafts* (Zhu *et al.*, 2006). Si bien los mecanismos moleculares que subyacen a las asociaciones entre los *rafts* y el nAChR no se conocen completamente, se ha demostrado que existen interacciones favorables entre el nAChR y estos dominios (Baenziger *et al.*, 2017).

En la unión neuromuscular se ha postulado la presencia de agregados de nAChRs en dominios lipídicos ricos en Col junto con las proteínas postsinápticas rapsina, MuSK y distintas kinasas. El Col estabilizaría la unión neuromuscular y promovería su maduración (Willmann *et al.*, 2006); una depleción del Col de la membrana produce una marcada alteración de la organización de los nAChRs en esta zona (Kellner *et al.*, 2007).

Existen actualmente ciertas controversias sobre la organización del nAChR en la unión neuromuscular. Una hipótesis sugiere que luego de un estímulo de agrina los nAChRs y la proteína MuSK se movilizan hacia los dominios *raft* donde se produce la agregación de los nAChRs. Una disrupción de estos microdominios por disminución de los niveles de Col inhibe la estimulación por agrina y, de ese modo, la formación y mantenimiento de los *clusters* de nAChR (Zhu *et al.*, 2006). En concordancia con esta hipótesis, un estudio contemporáneo sugiere que la agrina causa la movilización de los nAChRs hacia los dominios *raft* (Campagna y Fallon, 2006). Una hipótesis diferente indica que la agrina no produce el reclutamiento de los nAChRs hacia los dominios *raft*, ya que estos receptores se encuentran en esos dominios independientemente de la activación de la agrina. Dicha hipótesis indica que la agrina produce la coalescencia de los *rafts*, lo que lleva a la agregación de los nAChRs (Marchand *et al.*, 2002; Stetzkowski-Marden *et al.*, 2006a,b; Brockhausen *et al.*, 2008; Cartaud *et al.*, 2011).

Diferentes resultados sobre la interacción entre el nAChR muscular y los dominios lipídicos han sido obtenidos trabajando en sistemas modelos. Bermúdez y colaboradores (2010) observaron que luego de la reconstitución de nAChR de *T. californica* en membranas modelo simétricas con coexistencia de dominios Lo y Ld, la proteína se distribuye homogéneamente en ambos dominios. Experimentos similares llevados a cabo con un péptido sintético correspondiente a la porción TM4 de la subunidad  $\gamma$  ( $\gamma$ TM4) mostraron una marcada preferencia de este péptido por los dominios Lo (de Almeida *et al.*, 2004; Bermúdez *et al.*, 2010). Esto demostró que, aunque este segmento transmembrana le otorgue al nAChR la potencialidad para localizarse en dominios *raft* se necesitan además otras condiciones internas y/o externas para que esto ocurra. Una de estas condiciones evaluadas fue la asimetría de membrana. Un aumento de la SM en la hemicapa externa de la membrana denotó un incremento en la cantidad de moléculas de nAChR en los dominios Lo (Perillo *et al.*, 2016). La estructura en forma de cono del nAChR haría que éste se “acomode” mejor en una fase Ld flexible, o una fase Lo pero que tenga un alto grado de curvatura espontánea debido a la asimetría transmembrana (Brannigan, 2017). Un estudio reciente concluyó que cuando el nAChR se reconstituye en un sistema de lípidos DPPC:Col:PE/PC conteniendo PUFAs, este se localiza en dominios Ld pobres en Col y ricos en PUFAs (Sharp *et al.*, 2019). Sin embargo, las membranas simuladas en este trabajo no contenían SM, lípido esencial para la formación de *rafts*, y eran simétricas, condición diferente a lo que ocurre en las membranas biológicas. Esto enfatiza el hecho de que no solo la presencia de dominios Lo condicionaría la aglomeración del nAChR

muscular, sino también las características fisicoquímicas y los componentes lipídicos específicos de los mismos.

Con respecto al nAChR  $\alpha 7$  neuronal, se ha observado que el mismo se encuentra asociado a microdominios ricos en Col en neuronas ciliares (Brusés *et al.*, 2001). Una disrupción de los dominios Lo en estas células produjo un aumento de la movilidad de  $\alpha 7$  hacia y desde el espacio sináptico de la membrana (Fernandes *et al.*, 2010). Una disrupción de los dominios *raft* en neuronas de hipocampo de ratas afectó significativamente la cinética de desensibilización de  $\alpha 7$ , ya que provocó un aumento de la velocidad de recuperación de la desensibilización y un aumento de la afinidad por el agonista (Colón-Sáez y Yakel, 2011).

Si bien aún es necesario mucho más conocimiento para entender completamente cómo los diferentes lípidos influyen en la función del nAChR en un contexto biológico, los resultados obtenidos hasta el momento permiten afirmar que la funcionalidad del nAChR tanto muscular como  $\alpha 7$  neuronal es modulada por el microentorno lipídico en el que se encuentran, siendo los dominios *raft* de crucial importancia.

Una de las razones de la gran complejidad y dificultad que existe al estudiar las interacciones entre lípidos y el nAChR (u otros canales iónicos), se debe al hecho de que los lípidos ejercen sus efectos en la función del canal tanto por mecanismos directos como indirectos. Por ejemplo, un determinado lípido puede unirse preferencialmente a un sitio de la proteína en estado de reposo, estabilizar así una mayor proporción de nAChRs activables y promover de esa forma la funcionalidad (acción directa); al mismo tiempo, ese mismo lípido puede alterar las propiedades físicas de la membrana de una manera tal que favorezca una conformación no activable del receptor (acción indirecta) (Baenziger *et al.*, 2017). Con respecto al Col, éste se une a sitios específicos en el dominio transmembrana del nAChR pero además aumenta el orden de la membrana, lo que también influye en la función del nAChR (Baenziger *et al.*, 2015). Además, los lípidos de la membrana influyen la función del nAChR tanto por selección conformacional como por mecanismos cinéticos. Es decir, modifican la magnitud de la respuesta al agonista ya sea alterando las proporciones relativas de receptor en estado de reposo, desensibilizado o desacoplado, así como las transiciones entre estos estados (Baenziger *et al.*, 2015). Aunque los mecanismos por los que los distintos lípidos interactúan preferencialmente con estas diferentes conformaciones o estados aún no se conocen completamente, cada vez más evidencia apunta al rol del segmento TM4.

## - ROL DEL SEGMENTO TM4 DEL nAChR

Como se describió anteriormente, los segmentos TM4 de la región transmembrana de los nAChRs presentan el mayor contacto con los lípidos de la membrana. Su localización en la periferia del dominio transmembrana llevó a pensar que TM4 tiene un rol central como sensor lipídico (Barrantes, 2003; Antollini *et al.*, 2005). Se ha demostrado que mutaciones en distintos residuos de este segmento, tanto en nAChR de *T. californica* como muscular, producen un cambio en la interacción entre TM4 y los lípidos, y eso altera la función del receptor (Lee *et al.*, 1994; Lasalde *et al.*, 1996; Bouzat *et al.*, 1998; Tamamizu *et al.*, 2000; Ortiz-Acevedo *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Diaz-De Leon *et al.*, 2008; Caballero-Rivera *et al.*, 2012).

La región transmembrana interactúa directamente con los lípidos de la membrana y con residuos de importancia en el *Cys-loop*, y se cree que de esa forma modularía las interacciones en la interfase entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del nAChR. El dominio C-terminal de TM4 se extiende más allá de la bicapa lipídica e interactúa con un residuo conservado (Phe137) en el *Cys-loop*. daCosta y Baenziger (2009) hipotetizaron que las propiedades de la bicapa son importantes para posicionar al extremo C-terminal de TM4 de manera que entre en contacto con el *Cys-loop*. Debido a que el *Cys-loop* tiene un rol central en la interfase entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del nAChR, ha sido postulado que las interacciones entre el TM4 y el *Cys-loop* son de fundamental importancia para el acoplamiento entre la unión del agonista y el gatillado del canal (daCosta y Baenziger, 2009). Estudios más recientes del mismo laboratorio reforzaron la importancia de TM4, sin embargo, concluyeron que no sería la interacción de su segmento C-terminal con el *Cys-loop* la responsable de modular la función del nAChR en respuesta al entorno lipídico (Domville y Baenziger, 2018). Si bien TM4 presenta el mayor contacto con los lípidos en la membrana, estos también se unen en la interfase entre TM4 y las subunidades adyacentes TM1 y TM3 (Henáult, 2015). El Col y otros lípidos alterarían la función del nAChR modulando las interacciones entre TM4 y las subunidades adyacentes TM1 y TM3 (Domville y Baenziger, 2018).

## 5. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La organización mundial de la salud (OMS) declaró a la demencia como una prioridad para la salud pública (en *Priority Medicines for Europe and the World, "A Public Health Approach to Innovation"* by Saloni Tanna). El número de personas con esta

condición a nivel mundial está en continuo crecimiento: en el 2010 el número se estimaba en 35,6 millones, mientras que se esperan cerca de 115,4 millones de personas con demencia para el 2050.

La EA es la forma más común de demencia en adultos mayores. Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, caracterizada por la pérdida de memoria, múltiples deficiencias cognitivas y cambios en la personalidad y el comportamiento. Varias décadas de estudio han puesto de manifiesto los diversos cambios celulares que se encuentran involucrados en el progreso de esta enfermedad, incluyendo el daño sináptico, anomalías mitocondriales y respuestas inflamatorias, en adición a la formación y acumulación de placas seniles de  $\beta$ -amiloide y a la acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada (Feng y Wang, 2012; Kumar *et al.*, 2016; Kandimalla y Reddy, 2017). Todo esto ocasiona, en última instancia, la muerte celular.

A fines de 1960 se realizaron los primeros estudios en cerebros de pacientes con EA fallecidos (Francis *et al.*, 1999) y, desde ese entonces, varias y diversas hipótesis han sido postuladas para intentar explicar las causas y mecanismos de esta enfermedad. Entre ellas se pueden mencionar la hipótesis colinérgica (Bartus *et al.*, 1982) y la hipótesis de la cascada amiloide (Hardy y Allsop, 1991; Hardy y Higgins, 1992), la que involucra a la proteína tau hiperfosforilada (Götz *et al.*, 2004) y el estrés oxidativo (Butterfield y Boyd-Kimball, 2005). A pesar de esto, hoy en día aún siguen existiendo ciertas controversias sobre las causas de la EA, y es por eso que el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad continúa siendo un gran desafío (Dineley, 2007).

#### - COLESTEROL y $A\beta$ : HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDE

En la EA se produce la formación de péptidos extracelulares insolubles a partir de la degradación de una proteína transmembrana, la proteína precursora amiloidea (APP), de manera secuencial por dos enzimas,  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa. Los péptidos anfifílicos así formados son llamados péptidos  $A\beta$  (Iwatsubo *et al.*, 1994). Alternativamente, la APP puede ser degradada por la enzima  $\alpha$ -secretasa produciendo la generación de  $A\beta$ PP, un péptido no neurotóxico. A lo largo de la vida de una persona hay una continua formación de estos péptidos a los que se les atribuye diversas funciones fisiológicas. Concentraciones picomolares de los mismos tienen implicancias fisiológicas en la plasticidad sináptica y la memoria, entre otras (Puzzo *et al.*, 2008, 2011, 2015). La hipótesis amiloidea postula que la desregulación del equilibrio enzimático con la consecuente acumulación de los péptidos  $A\beta$  causa la EA. Uno de los péptidos producidos por la actividad de las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa es el  $A\beta_{1-42}$ , que posee una gran tendencia a la formación de oligómeros,

protofibrillas y fibrillas, lo que contribuye a la formación de las placas seniles en los cerebros de pacientes con EA (Jarrett *et al.*, 1993; Gu y Guo, 2013).

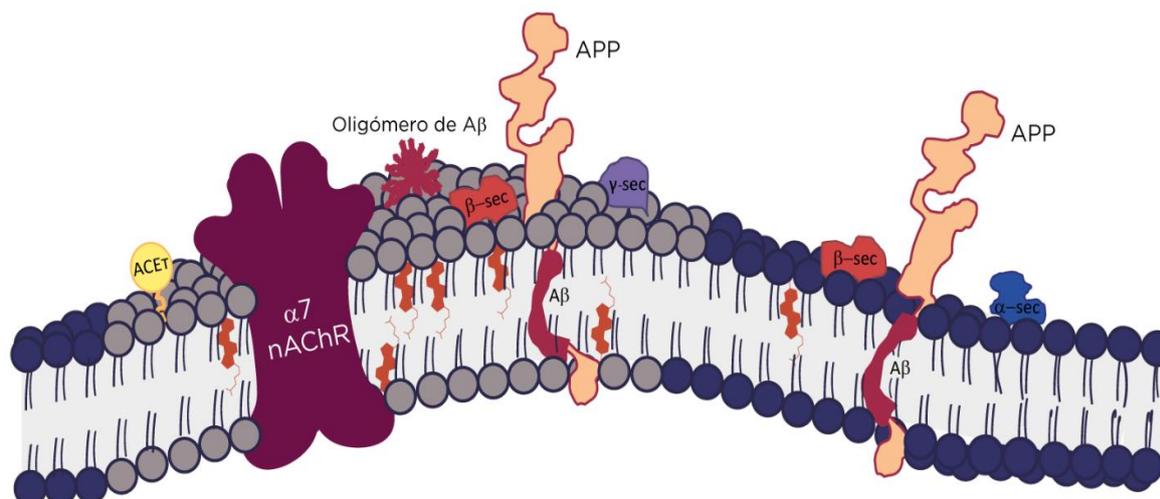
La degradación de la proteína APP ocurre en las membranas. Lukiw (2013), en su trabajo “*Alzheimer’s disease (AD) as a disorder of the plasma membrane*”, destacó la implicancia de las membranas en la fisiopatología de esta enfermedad (Lukiw, 2013). Varios estudios postulan que distintos componentes de la membrana condicionan el procesamiento de la APP (Fabiani y Antollini, 2019). En particular, el Col ha sido relacionado con la EA de varias maneras y existen aún controversias sobre el papel que cumple en esta enfermedad. Lahdo y De La Fournière-Bessueille (2004) estudiaron los requerimientos lipídicos de una membrana para la inserción de la APP y concluyeron que esta depende del contenido de Col (se necesitaría aproximadamente un 30 % de este lípido) y de la relación Col/PC y Col/SM, así como también del orden de membrana. Si el contenido de Col en la membrana es menor a un 30 %, la APP se localiza en la superficie de la membrana adoptando una conformación de lámina  $\beta$ , mientras que, si el porcentaje de Col aumenta, la APP puede insertarse en la membrana espontáneamente cambiando su conformación a hélices  $\alpha$ . Como consecuencia de esto, una vez que la APP se encuentra en la membrana es capaz de modificar las propiedades biofísicas de la misma y la actividad de diversas proteínas transmembrana o asociadas (Lahdo y De La Fournière- Bessueille, 2004).

La concentración y localización del Col en las membranas celulares en el cerebro cambian a lo largo de la vida de una persona. En edades tempranas cerca del 87 % del Col está localizado en la hemicapa interna de las membranas; con los años, el porcentaje de Col aumenta en la hemicapa externa, produciendo la pérdida de la asimetría transmembrana y alcanzando el valor crítico (30 %) para la inserción de la APP en la membrana (Igbavboa *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2002).

La importancia de la proporción de Col en la membrana para la inserción de la APP lleva a pensar que esta estaría localizada preferentemente en dominios *raft* (Cordy *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2007) y que la degradación de la misma por la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas causando la formación de péptidos A $\beta$  ocurriría también en estos dominios (Lee *et al.*, 1998). Por otro lado, se cree que la vía no amiloidogénica, a través de la  $\alpha$ -secretasa, ocurre en dominios *no-raft* (Kojro *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2007). Experimentos en células sobreexpresando tanto la APP como las enzimas necesarias para su clivaje por la vía amiloidogénica mostraron que estas se localizan en dominios ricos en Col (Burns y Duff, 2002; Eehalt *et al.* 2003) y que la depleción del mismo reduce la producción del péptido A $\beta$  (Simons *et al.*, 1998; Fassbender *et al.*, 2001; Eehalt *et al.*, 2003). Varios estudios

sugieren que la APP está presente en dos *pools*: uno en dominios *raft* y otro en *no-raft*. Ehehalt y colaboradores (2003) concluyeron que esta compartimentalización explica el hecho de que una misma proteína pueda ser procesada de dos maneras diferentes. Más aún, postularon que si bien la  $\beta$ -secretasa está presente en ambos dominios, solo cuando se encuentra en dominios *raft* es funcional (Ehehalt *et al.*, 2003). Esta sería la razón por la cual, cuando el Col disminuye, también lo hace la formación de péptidos A $\beta$ . Un estudio en membranas de hipocampo humano mostró que la mayoría de la APP se encuentra en dominios *no-raft*, mientras que la  $\beta$ -secretasa se encuentra tanto en dominios *raft* como *no-raft*. (Abad-Rodriguez *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores (Mason *et al.*, 1992; Roth *et al.*, 1995) propusieron una explicación opuesta a la anterior: cuando el Col disminuye, la  $\beta$ -secretasa aumenta en los dominios *no-raft* y de esa manera ocurre un aumento de la producción de péptido. Concluyeron que la  $\beta$ -secretasa en dominios *raft* corresponde a la fracción inactiva y que necesita translocarse a los dominios *no-raft* para ser funcional. De esta manera, el Col condicionaría directamente el procesamiento de la APP “permitiendo” a la  $\beta$ -secretasa moverse entre uno y otro dominio. Sin embargo, estos autores observaron diferencias entre una reducción moderada del Col en las membranas (menos del 25 %), que resulta en un aumento del procesamiento de la APP, y una reducción drástica de este lípido (más del 35 %) que produce una disrupción de la integridad de la membrana con una disminución concomitante de la producción de A $\beta$ . Trabajando con cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas, Simons y colaboradores (1998) llegaron a una conclusión diferente. Demostraron que una disminución del Col de hasta un 60-70 % no afectaba el procesamiento de la APP por la  $\alpha$ -secretasa, pero reducía drásticamente la cantidad de A $\beta$  (Simons *et al.*, 1998). De esta manera, la depleción del Col parecería dirigir el procesamiento de la APP desde el clivaje amiloidogénico al no amiloidogénico. Eckert y colaboradores (2003) demostraron que la depleción del Col disminuye la proporción de APP en dominios *raft*, y en consecuencia la producción de A $\beta$ . Por otro lado, un aumento del Col en células Niemann Pick tipo C produjo un aumento de la localización de la APP en dominios *raft* (Eckert *et al.*, 2003).

Con respecto a la  $\gamma$ -secretasa existe un mayor consenso sobre su localización en la membrana. Esta enzima se localiza en dominios *raft*, confirmando que el último paso en la generación del péptido A $\beta$  ocurre en esos dominios (Vetrivel *et al.*, 2005). A pesar de los resultados controversiales, no hay dudas de que el procesamiento de la APP se ve influenciado por la composición lipídica de la membrana en la que esta proteína y las enzimas que catalizan su clivaje se localizan (Figura 15).



**Figura 15.** Esquema de la membrana plasmática representando la relación espacial de las distintas moléculas involucradas en la síntesis de A $\beta$  y el sistema colinérgico. Dos colores diferentes se utilizan para representar un dominio *raft* y un dominio *no-raft* (gris y azul, respectivamente).

El Col tiene un papel importante, además, en la acción o efecto del A $\beta$  (Eckert *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2014). Este péptido puede existir en forma de monómero, oligómero o fibrillas y adoptar diferentes conformaciones de acuerdo a su entorno (Klein *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2007). Varios estudios indican que el Col es capaz de unirse, como fue descrito previamente, a la APP (Beel *et al.*, 2010), pero además a los péptidos A $\beta$  monoméricos y oligoméricos, a los agregados y a las fibrillas (Avdulov *et al.*, 1997; Harris, 2008). Por técnicas de resonancia magnética, Beel y colaboradores (2010) identificaron una secuencia de 5 aminoácidos (VGSNK) presente tanto en la APP como en los péptidos A $\beta$  que interacciona con el Col, probablemente mediante puentes de hidrógeno (Beel *et al.*, 2010). La interacción entre A $\beta$ <sub>1-42</sub> y los dominios *raft* fue demostrada además por microscopía confocal y anisotropía de fluorescencia (Lin *et al.*, 2001).

El mecanismo por el cual se produce la disfunción cerebral en pacientes con EA permanece desconocido. Si bien en un comienzo se consideraba a las placas amiloides extracelulares responsables de la patogénesis de esta enfermedad (Hardy y Higgins, 1992; Haass, 1996; Rushworth y Hooper, 2011; Serrano-Pozo *et al.*, 2011), actualmente se considera de gran importancia la interacción de los péptidos A $\beta$  con la membrana (Relini *et al.*, 2014). Una explicación reciente indica que los monómeros de A $\beta$ , así como también los pequeños oligómeros, serían los responsables de la muerte celular, y que las placas amiloides en realidad reducirían la muerte neuronal mediante la captación de estos monómeros o pequeños oligómeros (Irvine *et al.*, 2008; Shankar *et al.*, 2008; Arbor *et al.*,

2016). Esta explicación es contraria a la hipótesis anterior que considera que la agregación de péptidos A $\beta$  en una conformación de lámina  $\beta$ , la cual culminaría en la formación de fibrillas neurotóxicas, se ve reducida por la inserción de A $\beta$  en forma de hélices  $\alpha$  en membranas ricas en Col (Ji *et al.*, 2002). Estos autores concluyeron que un enriquecimiento en Col sería beneficioso para reducir la formación de fibrillas. Esta condición es contraria a lo que ocurre en pacientes con EA, en cuyos cerebros se observa una disminución marcada del contenido de Col en las membranas y, por lo tanto, no tendrían las condiciones requeridas para la inserción de A $\beta$ , lo que favorecería la agregación y por lo tanto la patogenicidad (Ji *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 1992; Roth *et al.*, 1995). De esa manera, A $\beta$  permanecería en la superficie de la membrana celular con una gran tendencia a formar agregados y en última instancia placas amiloides (Ji *et al.*, 2002).

Tanto los niveles de Col como la composición de la bicapa lipídica en general afectan la forma en que A $\beta$  en sus diferentes conformaciones interactúa con la membrana. La inserción de los péptidos A $\beta$  en la membrana tiene, a su vez, consecuencias sobre la misma. Una consecuencia importante es la formación de canales de calcio (Lin *et al.*, 2001), lo que ha sido relacionado con la neurotoxicidad observada en membranas de células de hipocampo (Sepúlveda *et al.*, 2014). Desde que se postuló la existencia de estos canales transmembrana formados por péptidos A $\beta$  (Arispe *et al.*, 1993a,b), varios estudios profundizaron sobre este tema (Pollard *et al.*, 1995; Kagan *et al.*, 2002; Kawahara, 2010). El primer paso en la formación del canal debe ser el contacto entre los péptidos y la membrana, y ha sido demostrado que tanto la composición lipídica de la misma como la conformación estructural del péptido son esenciales para esta interacción (Hertel *et al.*, 1997; Terzi *et al.*, 1997; Rondelli *et al.*, 2016). Otras interacciones específicas entre los lípidos y los péptidos A $\beta$  que inducen cambios en las membranas produciendo la disrupción de las mismas han sido descritas (Qiang *et al.*, 2014). Vestergaard y colaboradores (2010) observaron cambios morfológicos en las membranas inmediatamente luego de la adición de los péptidos a las mismas y sugirieron que tanto los niveles de Col como la composición lipídica general afectan la forma de interacción de los oligómeros con la membrana (Dies *et al.*, 2014). Una disminución de la fluidez de membranas de neuronas de ratón y de rata ((Müller *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2001) y de células HEK293 y de neuroblastoma SH-SY5Y (Peters *et al.*, 2009) fue observada en presencia de péptidos A $\beta$ . La inserción de A $\beta$  en la membrana no solo potencia su propia formación, sino que además activa una variedad de procesos dependientes de membrana que podrían conducir a la muerte neuronal (Kanfer *et al.*, 1999).

Si bien la hipótesis de la cascada amiloide es actualmente la explicación más aceptada, esta no puede explicar varios de los aspectos que ocurren en esta patología multifactorial (Herrup, 2015). Por otro lado, la mayoría de los ensayos clínicos conducidos a disminuir la cantidad de péptido A $\beta$  no han dado, por el momento, resultados favorables (Puzzo *et al.*, 2015; Maia y Sousa, 2019). Este hecho es una de las causas por la cual la atención esté puesta nuevamente sobre la hipótesis colinérgica.

#### - RECEPTORES NICOTÍNICOS Y ACETILCOLINESTERASA: HIPÓTESIS COLINÉRGICA

La relación entre los nAChRs, particularmente el nAChR  $\alpha 7$  neuronal, y la EA ha sido largamente estudiada (Lombardo y Maskos, 2014). Los niveles de este receptor cambian durante el desarrollo y la vida adulta, y en los pacientes con EA, ha sido demostrado que su expresión disminuye significativamente (Perry *et al.*, 1981, 1985; Whitehouse *et al.*, 1981, 1982, 1986; Coyle *et al.*, 1983; Shimohama *et al.*, 1986; Paterson y Nordberg, 2000; Auld *et al.*, 2002; Ma y Qian, 2019).

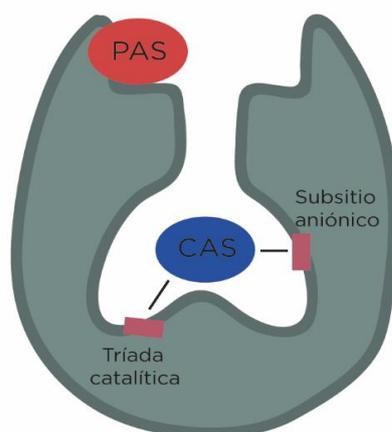
La hipótesis colinérgica propuesta para la EA postula que en los cerebros de los pacientes que la padecen se produce una disminución importante en la cantidad total de nAChRs (Whitehouse *et al.*, 1982; Banerjee *et al.*, 2000) como resultado de la muerte progresiva de neuronas colinérgicas (Bartus *et al.*, 1982; Court *et al.*, 2000; Contestabile, 2011; Hampel *et al.*, 2018), que lleva a la disrupción de las vías colinérgicas, fundamentalmente en la corteza cerebral y en el prosencéfalo basal, y que contribuye, por lo tanto, al deterioro cognitivo.

Se ha demostrado que la forma soluble de los péptidos A $\beta$  en concentraciones picomolar interacciona con los nAChR  $\alpha 7$ , aparentemente con una alta afinidad (Wang *et al.*, 2000; Lasala *et al.*, 2018) regulando su función (Dineley *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001; Pettit *et al.*, 2001). Se hipotetizó que en condiciones fisiológicas ocurre una retroalimentación positiva: los péptidos A $\beta$  liberados actúan como ligandos de los nAChR, lo que induce la liberación de neurotransmisores y potencia la plasticidad sináptica y la memoria. En condiciones patológicas, una acumulación anormal de A $\beta$  (concentración nanomolar) induce una retroalimentación negativa, la cual causa la inhibición e internalización de los receptores y lleva a una disfunción sináptica (Näslund *et al.*, 1994, 2000; Tapiola *et al.*, 2000; Andreasen *et al.*, 2003).

Dado que la pérdida de las funciones cognitivas observada en pacientes con EA está fuertemente correlacionada con una disrupción en la neurotransmisión colinérgica, una potenciación de esta neurotransmisión, ya sea por inhibición de la ACE o por potenciación

de los nAChRs, mejoraría la memoria y la cognición de los pacientes que padecen esta enfermedad (Craig *et al.*, 2011).

Actualmente, la inhibición de la ACE es el único tratamiento aprobado para la EA. El último paso en la transmisión colinérgica es la degradación de la ACh presente en la hendidura sináptica por la enzima ACE, enzima capaz de degradar hasta 10000 moléculas de ACh por segundo. La ACE es una proteína globular que puede existir en diferentes formas moleculares, dependiendo del *splicing* del gen que la codifica (Henderson *et al.*, 2010). Consiste en una larga serie de láminas  $\beta$  rodeadas de 15 hélices  $\alpha$  que presenta dos sitios activos, el sitio catalítico (CAS) y el sitio aniónico periférico (PAS). El CAS está localizado en el fondo de una estrecha y profunda cavidad y es donde se lleva a cabo la hidrólisis de la ACh (Figura 16). Este sitio consiste a su vez en 2 “subsitos”: el aniónico, que atrae por fuerzas electrostáticas al grupo amonio de la ACh y debido a interacciones hidrofóbicas con los grupos metilo del nitrógeno cuaternario de la colina dispone al sustrato en una orientación adecuada, y el subsitio esterático, el cual contiene la tríada E334, H447 y S203, responsable precisamente de la acción catalítica de la enzima. La entrada de la cavidad contiene el PAS, una región rica en aminoácidos aromáticos que actúa como sitio de transición uniendo la ACh y transfiriéndola luego hacia el CAS. Este sitio es también un importante blanco de interacción con distintas moléculas.



**Figura 16.** Esquema de la ACE mostrando los sitios activos de la enzima (CAS y PAS).

La forma predominante de esta enzima en el sistema nervioso central es la ACeT, que posee un péptido C-terminal de 40 aminoácidos llamado péptido T. Mediante puentes disulfuro, estos péptidos se unen para formar homodímeros u homotetrámeros de ACeT,

que pueden además unirse a otras proteínas. En el sistema nervioso central, la mayoría de la ACE se encuentra como ACEt tetramérica unida a una proteína de anclaje a la membrana plasmática, PRiMA (por sus siglas en inglés *proline-rich membrane anchor*) (Navaratnam *et al.*, 2000; Perrier *et al.*, 2002; Massoulié *et al.*, 2005), lo que constituye la unidad funcional en la sinapsis colinérgica (Perrier *et al.*, 2002; Dvir *et al.*, 2010; Henderson *et al.*, 2010). Una parte significativa de la ACEt se localiza en dominios *raft* mediante una secuencia de reconocimiento de Col localizada en PRiMA (Xie *et al.*, 2010a,b). PRiMA puede, a su vez, unir la ACE a otras proteínas en áreas especializadas de la membrana; ha sido demostrada la unión de la ACE a los nAChRs en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Henderson *et al.*, 2010; Hicks *et al.*, 2012).

La ACE se encuentra implicada en la EA. Las interacciones entre la ACE y los péptidos A $\beta$  revisten una gran importancia en esta enfermedad (Inestrosa *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Small *et al.*, 2007) debido a que el péptido modifica distintas propiedades de la ACE alterando de esa forma su función (Geula y Mesulam, 1989). Además, la ACE se ha detectado en placas amiloides, evidenciando la alta afinidad que presentan estas moléculas y sugiriendo que la ACE podría promover la agregación de los péptidos A $\beta$  (Morán *et al.*, 1993; Inestrosa *et al.*, 1996). La unión entre la ACE y el péptido ocurre en el PAS de la enzima; por lo tanto, se cree que aquellos inhibidores de la ACE que se unen en este sitio reducirían la velocidad de agregación del A $\beta$  y la formación de fibrillas (Reyes *et al.*, 1997; Bartolini *et al.*, 2003).

Mucho esfuerzo ha sido puesto en encontrar la forma de potenciar la transmisión colinérgica que se ve disminuida debido a la pérdida de nAChRs. Los inhibidores de la ACE (tales como galantamina, huperzina A, fisostigmina) son considerados agonistas indirectos de los nAChRs debido a que aumentan localmente los niveles endógenos de neurotransmisor. Así, los únicos fármacos actualmente aprobados para el tratamiento de la EA, como la fisostigmina, tacrina, donepezil, rivastigmina y galantamina (Martorana *et al.*, 2010), están enfocados en inhibir la función de la ACE para aumentar, de esta manera, la concentración de ACh en la hendidura sináptica y mejorar los síntomas clínicos de esta enfermedad, aunque esto no detendría su progreso. Ha sido demostrado que los inhibidores que se unen al sitio aniónico de la ACE, así como los anticuerpos contra éste reducen significativamente la formación de fibrillas de A $\beta$  (Bartolini *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 1997). Si bien el dominio catalítico de la ACE no participa de esta interacción (Inestrosa *et al.*, 1996), compuestos que posean una acción dual (bloqueando tanto el sitio PAS como el sitio CAS) podrían por un lado prevenir la agregación del péptido A $\beta$  deteniendo de esa manera

la progresión de la EA, y al mismo tiempo inhibir la degradación de la ACh para aliviar la sintomatología (Alptuzun *et al.*, 2010).

En el presente trabajo de Tesis se abordó el estudio de la función y modulación de dos receptores de neurotransmisores pertenecientes a la familia de receptores *Cys-loop*, los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR muscular y neuronal) y los receptores de serotonina tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>) como blancos moleculares centrales en el desarrollo de drogas para el tratamiento de patologías neurodegenerativas en las cuales se encuentran involucrados. Los primeros 3 capítulos de la Tesis se centran en receptores nAChR, estando el último capítulo focalizado en el receptor 5-HT<sub>3</sub>.

En el **capítulo I** se estudió la modulación del nAChR muscular por el entorno lipídico de la membrana en la que se encuentra, y cómo distintas alteraciones en el Col afectan tanto la función como la localización del nAChR en la misma.

En el **capítulo II** se estudió la relación del nAChR neuronal con el péptido  $\beta$ -amiloidé desde un punto de vista funcional y conformacional, como un primer paso en la comprensión de uno de los múltiples efectos que dicho péptido ocasiona en la EA.

El **capítulo III** se centró en el descubrimiento y optimización de nuevas moléculas bifuncionales, activadoras del nAChR e inhibidoras de la ACE, ambos blancos moleculares cruciales en la EA.

En el **capítulo IV** se estudió por primera vez la modulación ortostérica y alostérica del 5-HT<sub>3</sub> humano a nivel de canal único, como un primer paso en la descripción mecanística de un nuevo blanco molecular en la EA ya que se ha visto que antagonistas del 5-HT<sub>3</sub> mejoran los síntomas de la EA (Werner y Coveñas, 2016) y además potencian la inhibición de la ACE por donepezilo (Skovgard *et al.*, 2018).

# **METODOLOGÍA**

## 1. MATERIALES

Los órganos eléctricos de *T. californica* se obtuvieron de la costa de California, E.E.U.U. (Aquatic Research Consultants, San Pedro, CA). Los peces se sacrificaron por ablación quirúrgica y los órganos eléctricos se disecaron y almacenaron a -70 °C hasta su uso. Las sondas fluorescentes Laurdan, 1,-6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), 1-(4-Trimetilamoniofenil)-6-difenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) se compraron en Molecular Probes (Eugene, OR, E.E.U.U.). El gel Affi- Gel® 10 se obtuvo de Bio-Rad. Los lípidos sintéticos se compraron en Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL, E.E.U.U.). El PNU-120596 (N-(5-Chloro-2,4- dimethoxyphenyl)-N'-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea) fue obtenido de Tocris Biosciences (Bristol, UK). La sonda fluorescente Cristal Violeta (CrV), las enzimas acetilcolinesterasa (ACE) y colesterol oxidasa (Cox) y todas las demás drogas utilizadas en este trabajo de Tesis se obtuvieron en la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.E.U.U.).

## 2. PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES MODELOS DE ESTUDIO

### 2.1. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS DE *Torpedo californica*

#### 2.1.1. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS CRUDAS

Para los estudios en los que se trabajó con el nAChR en sistema nativo se utilizó el órgano eléctrico de *T. californica*, a partir del cual se obtuvieron fragmentos de membranas ricas en nAChR siguiendo el protocolo propuesto por Barrantes (Barrantes, 1982). El tejido (mantenido a -70 °C) se descongeló en hielo utilizando *buffer* de Homogeneización (BH) (*buffer* fosfato de sodio 10 mM pH 7,4, NaCl 0,4 M, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) y NaN<sub>3</sub> 0,02 % (p/v)). Una vez descongelado, se lo cortó en pedazos pequeños y se homogeneizó en frío utilizando un homogeneizador Virtis 60 K (The Virtis Company, Inc., Gardiner, NY, E.E.U.U.) con tres ciclos de 30 segundos cada uno. El homogenado obtenido fue centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 4 °C en la centrífuga Avanti J-26 XP de Beckman Coulter utilizando un rotor Beckman Coulter JA-17. El *pellet* obtenido se descartó y el sobrenadante fue filtrado y centrifugado a 16000 rpm durante 2 horas a 4 °C utilizando el rotor JA-17 en la misma centrífuga. Luego de esta segunda centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* se homogeneizó utilizando un homogeneizador manual vidrio-teflón A 740 (Thomas Scientific, Swedesboro,

NJ, E.E.U.U.). La fracción subcelular así obtenida corresponde al total de las membranas plasmáticas del órgano eléctrico de *T. californica*, llamadas membranas crudas. La concentración proteica de las membranas crudas se obtuvo siguiendo el método de Lowry y colaboradores (Lowry *et al.*, 1951).

### 2.1.2. OBTENCIÓN DE MEMBRANAS RICAS EN nAChR

Para la obtención de la fracción de membranas nativas ricas en nAChR, las membranas crudas obtenidas previamente se resuspendieron en BH y se llevaron a un volumen final de 50 ml con sacarosa 50 % para tener un 30 % final de sacarosa. Luego se sembraron arriba de un gradiente discontinuo de sacarosa (50 %, 39 % y 35 % (p/v)) que se centrifugó utilizando el rotor Beckman Coulter SW28 en una ultracentrífuga Optima L-90K de Beckman Coulter a 27000 rpm por 2,5 horas a 4 °C. Luego de la centrifugación, en el gradiente se observan tres bandas que han sido previamente caracterizadas por Elliott y colaboradores (Elliott *et al.*, 1980). De las bandas obtenidas, la banda del medio (*middle*) corresponde a la fracción de membrana plasmática rica en nAChR, la cual posee una actividad específica del orden de 1,0-1,5 nmol de sitios de  $\alpha$ -BTX/mg de proteína (Barrantes, 1982). Una vez llevada a cabo la separación de la fracción *middle*, el volumen obtenido se diluyó 2 veces con BH y se centrifugó en la misma ultracentrífuga utilizando un rotor Beckman Coulter 70.1 Ti, a 45000 rpm y 4 °C durante 45 minutos para eliminar el exceso de sacarosa. El *pellet* obtenido fue resuspendido en BH y fraccionado para su almacenamiento (Figura 17 A). La concentración proteica de las muestras se obtuvo siguiendo el método de Lowry y colaboradores (1951). Las mismas fueron luego conservadas a -20 °C hasta su uso.

### 2.1.3. OBTENCIÓN DE PROTEOLIPOSOMAS DE nAChR

Para realizar los estudios con el nAChR purificado y reconstituido en sistemas modelo de composición lipídica definida se prepararon proteoliposomas conteniendo el nAChR con una mezcla de lípidos formada por palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC), Col y esfingomielina de cerebro (bSM) en una relación 1:1:1.

#### - PREPARACIÓN DE LA COLUMNA DE AFINIDAD

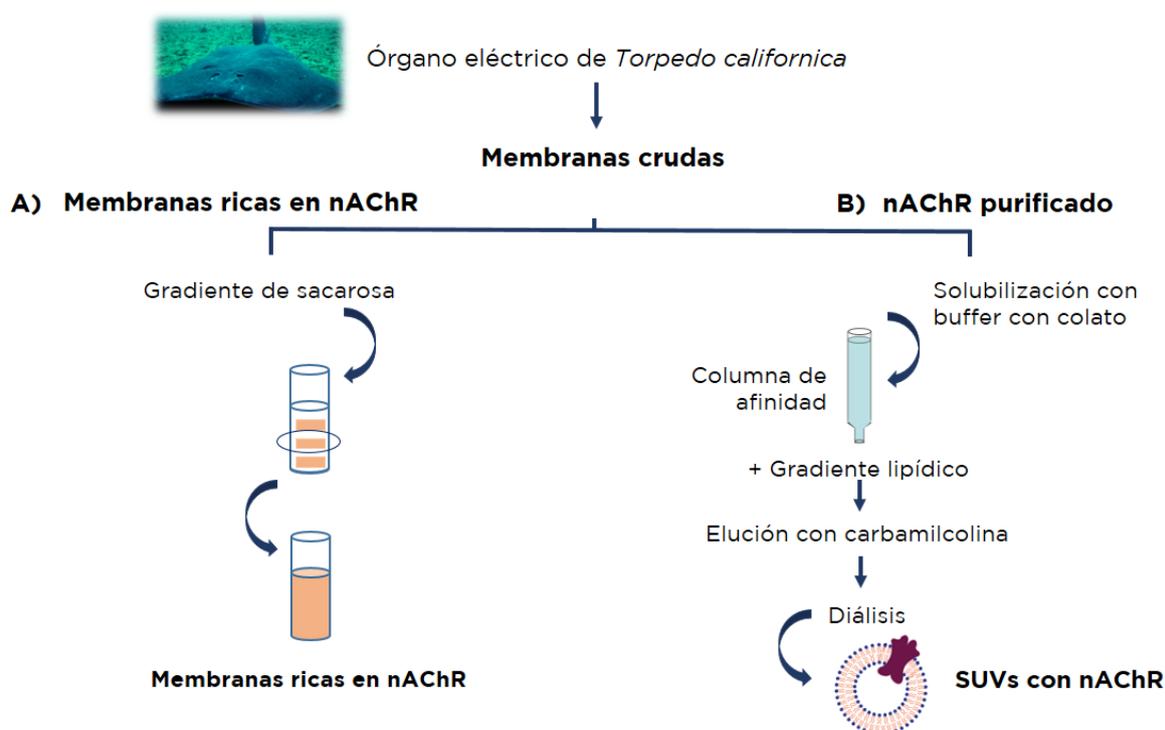
Como primer paso para preparar la columna de afinidad se lavó 8 ml de la solución de Affi-Gel 10 (soporte utilizado para la misma) con agua, a fin de eliminar el isopropanol con el que se lo conserva. Luego al Affi-Gel 10 se le agregó hidrocloreuro de cistamina 2 %

(p/v) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 7,4 y se agitó durante 1 hora en atmósfera de N<sub>2</sub>. Posteriormente se agregó etanolamina 1 M pH 8, se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, se lo drenó y lavó nuevamente con agua. A continuación, el Affi-Gel 10 se agitó con una solución de DTT 2,8 % (p/v) en *buffer* fosfato 0,1 M pH 8 por 1 hora a temperatura ambiente y en atmósfera de N<sub>2</sub>. La columna se dejó drenar testeando en el eluato la presencia de grupos sulfhidrilos mediante la titulación con 5'5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), lo que se hace evidente por el color amarillo brillante observado. La columna fue lavada una vez más con agua para eliminar el exceso de ditiotreitól (DTT), realizándose nuevamente la prueba con DTNB. Este lavado se realizó hasta que el ensayo dio negativo (sin color), demostrando esto la ausencia de sulfhidrilos libres y de DTT. A continuación, y como control, el Affi-Gel 10 se agitó con *buffer* fosfato 0,1 M pH 7,4 y se tomó una muestra para el ensayo de DTNB, obteniéndose un color amarillo brillante que indica la presencia de grupos sulfhidrilos libres. Para unir el ligando específico a los grupos sulfhidrilos libres de la columna y obtener de esa manera la columna de afinidad, el Affi-Gel 10 se agitó con bromuro de bromoacetilcolina en *buffer* fosfato pH 7,4 durante 1 hora. La columna se lavó nuevamente con agua y se guardó a 4 °C hasta su uso.

#### - PURIFICACIÓN DEL nAChR Y RECONSTITUCIÓN DE PROTEOLIPOSOMAS

La purificación del nAChR se realizó a 4 °C, para lo que se utilizó un soporte rodeando la columna dentro del cual se hizo circular agua a 4°C, lo que permitió mantenerla a una temperatura adecuada. Las membranas crudas de *T. californica* obtenidas previamente se solubilizaron con colato de sodio al 1 % en una concentración proteica de 2 mg/ml durante 1 hora a 4 °C. El solubilizado obtenido se centrifugó a 34000 rpm y 4 °C durante 45 minutos en la ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K utilizando el rotor 70.1 Ti. El sobrenadante obtenido se hizo pasar a través de la columna de afinidad dos veces para asegurar la adhesión de la mayor cantidad posible de nAChR a la columna. Para realizar el intercambio de los lípidos endógenos por los lípidos exógenos requeridos para el sistema modelo que se quería obtener, la columna se lavó con un gradiente lineal de lípidos (POPC:Col:bSM (1:1:1)) disueltos en *Buffer* de diálisis (BD) (NaCl 100 mM, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, pH 7,8) desde una concentración lipídica de 1,3 mM hasta una de 3,2 mM y luego descendente hasta 0,13 mM (da Costa *et al.*, 2002). El nAChR se eluyó luego de la columna con una solución de concentración lipídica de 0,13 mM en *Buffer* de elución (BE) (NaCl 250 mM, EDTA 0,1 mM, NaN<sub>3</sub> 0,02 %, fosfato 5 mM, pH 7,8, con colato 0,5 % y carbamilcolina (carb) 10 mM).

Se recolectaron 15 fracciones de aproximadamente 1 ml cada una. Para determinar las fracciones de interés, es decir las que contenían el nAChR, se midió la absorbancia de cada fracción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm. Se seleccionaron las fracciones con un valor de absorbancia igual o superior al valor de absorbancia basal más 0,05 unidades. Una vez obtenidas las fracciones con nAChR, se realizó la reconstitución de los proteoliposomas mediante diálisis en 1 litro de BD a 4 °C, realizando cinco cambios de *buffer*, uno cada 12 horas (Figura 17 B). La concentración proteica, una vez obtenidas las muestras, se determinó siguiendo el método de Lowry y colaboradores (1951). Dichas muestras fueron luego conservadas a -20 °C hasta su uso (Figura 17 B).



**Figura 17.** Preparación de sistemas modelo de nAChR a partir de membranas crudas obtenidas de órgano eléctrico de *T. californica* de A) Membranas ricas en nAChR y B) nAChR purificado.

## 2.2. OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMELARES GRANDES (LUVs)

Para la obtención de liposomas, la mezcla lipídica deseada, en este caso POPC:Col:bSM (1:1:1, relación molar), disuelta en solvente orgánico, se secó bajo  $N_2$  por 1 hora. A la película obtenida se le agregó BD (0,5 mg/ml) y se agitó vigorosamente por 1 minuto obteniéndose de esta forma vesículas multilameles (MLVs, *multilamellar vesicles*). Para obtener liposomas unilameles grandes (LUVs, *large unilamellar vesicles*)

y de tamaño uniforme, se utilizó el método de extrusión. Los MLVs obtenidos se extruyeron en una jeringa LiposoFast-Basic (Avestin Inc., Canadá), utilizando filtros con poros de 100 nm.

### 2.3. OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMELARES GIGANTES (GUVS)

Los liposomas unilamelares gigantes (GUVs) fueron obtenidos por electroformación. Se realizaron dos protocolos diferentes según los experimentos se desarrollaron en Argentina, ya sea en el Instituto Nacional de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) o en el Instituto de Física de Buenos Aires (IFIBA), o en Alemania, en el marco de una estadía corta en el *Department of Theory and Bio-Systems, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Potsdam*.

#### - PROTOCOLO 1 (UTILIZADO EN EL INIBIBB Y EL IFIBA, ARGENTINA).

A partir de una mezcla lipídica compuesta por POPC:Col:bSM (1:1:1) en solución etanólica (8 mM) se sembraron 10 µl sobre un vidrio cubierto con óxido de indio y estaño (ITO) del equipo de preparación de GUVs, Vesicle PrepPro (Nanion, Munich, Alemania), y se secaron bajo N<sub>2</sub> durante 1 hora hasta formar una película y eliminar todo resto de solvente. A la película obtenida se le agregaron 250 µl de una solución 450 mM de sacarosa. El vidrio se colocó con su lado conductor enfrentado al lado conductor de otro vidrio igual, quedando ambos separados por un anillo espaciador de manera tal de formar una cámara que contenga la solución lipídica. Los GUVs se formaron por aplicación de una corriente alterna de 3 V y una frecuencia de 10 Hz, durante 260 minutos a una temperatura de 45 °C. Las vesículas obtenidas se incubaron con la sonda fluorescente DiI-C18 (0,5 % v/v, en solución etanólica), se diluyeron luego en una solución de glucosa isoosmolar (aproximadamente 2 µl de GUVs en 200 µl de glucosa) y se observaron en un microscopio confocal Leica, TCS SP2 (INIBIBB) o en un microscopio confocal Olympus, FV100 (IFIBA) con un objetivo de inmersión en agua 63X/1,4 NA utilizando un láser de 543 nm He-Ne, con emisión colectada en el rango de 560-630 nm.

#### - PROTOCOLO 2 (UTILIZADO EN POTSDAM, ALEMANIA).

A partir de una mezcla lipídica compuesta por POPC:Col:eSM (1:1:1) o DOPC:Col:eSM (1:1:1) en solución clorofórmica (4 mM), la cual podía contener o no el péptido γTM4 (relación L:P 125:1 o 250:1) y a la que se le agregó 0,1 mol % de DiI-C18, se tomaron 10 µl

y se sembraron sobre 2 vidrios conductores. Estos se secaron bajo N<sub>2</sub> durante 1 hora hasta formar una película y eliminar los restos de solvente. Los vidrios se enfrentaron colocando un soporte entre ellos de manera tal de formar una cámara con las películas de lípidos hacia su interior, la cual se llenó luego con 1,8 ml de una solución de sacarosa 100 mM. El sistema así formado fue depositado dentro de una estufa a 60 °C y conectado a una corriente eléctrica de 1,6 V y 10 Hz, durante aproximadamente 1 hora, lo que permitió obtener los GUVs. Para su observación al microscopio se diluyeron en una solución de glucosa isoosmolar (aproximadamente 20 µl de GUVs en 100 µl de glucosa 100 mM). Las vesículas conteniendo el péptido  $\gamma$ TM4 fueron incubadas con una solución de 7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina (cumarina) en DMSO durante 2 horas a temperatura ambiente. La cumarina es fluorescente al reaccionar con grupos tioles, con una excitación/emisión máxima de ~384/470 nm. La relación molar péptido:cumarina fue de 1:10-1:20. Los GUVs fueron observados usando un microscopio confocal Leica TCS SP5 o SP8, con un objetivo de inmersión en agua 63X/1,4 NA.

#### 2.4. CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN

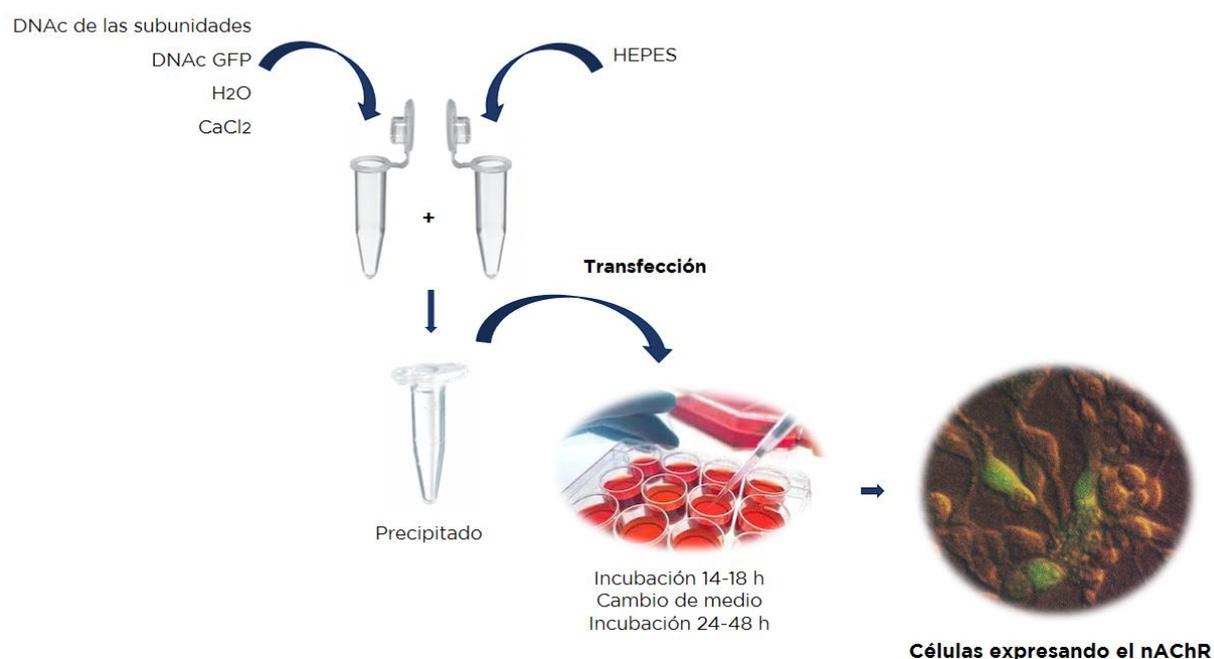
Células BOSC 23 (Pear *et al.*, 1993), derivadas de la línea HEK 293, fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM (*Dubecco's modified Eagle medium*, medio de Eagle modificado por Dubecco, Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Natocor), a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Las transfecciones de las subunidades correspondientes al receptor nicotínico muscular de ratón adulto (subunidades  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\epsilon$  y  $\delta$  en relación 2:1:1:1), al receptor neuronal humano (subunidad  $\alpha$ 7) o al receptor humano de serotonina tipo 3 (subunidad 5-HT<sub>3</sub>A) se realizaron mediante el método del fosfato de calcio. Para esto se emplearon cultivos celulares con un 40-50 % de confluencia. El ADNc de cada subunidad correspondiente a los receptores nicotínicos fue subclonado en el plásmido pRBG4. En cambio, la subunidad 5-HT<sub>3</sub>A fue subclonada en el vector de expresión pcDNA3.1. Las transfecciones se realizaron con 5 µg de ADNc total/cápsula de 35 mm. Para lograr la expresión del receptor  $\alpha$ 7 fue necesario agregar a la mezcla de transfección los ADNc correspondientes a las proteínas chaperonas Ric3 y NACHO (Gu, 2016) en una proporción molar  $\alpha$ 7:Ric-3:NACHO 1:2:1. Para el estudio del receptor homomérico de serotonina tipo 3A (5-HT<sub>3</sub>A), realizamos las mutaciones simultáneas R432Q, R436D y R440A para obtener así una subunidad de alta conductancia. La expresión de dicha subunidad permitió obtener receptores homoméricos de alta conductancia (5-HT<sub>3</sub>A<sub>HC</sub>) a partir de los cuales

pudimos realizar estudios de canales unitarios (Bouzat *et al.*, 2004; Corradi *et al.*, 2009, 2011; Rodríguez-Araujo *et al.*, 2020).

En todas las transfecciones realizadas se incorporó, además, un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*) en proporción 1:20 con respecto al resto de ADN. La GFP emite fluorescencia verde al ser excitada por luz ultravioleta, lo que permitió identificar a las células que incorporaron los plásmidos durante la transfección.

En todos los casos las células se dejaron en contacto con el precipitado de fosfato de calcio-ADN por 14-18 horas, luego se realizó el cambio de medio DMEM y se incubaron durante 24-48 horas más para permitir la expresión de los receptores (Figura 18).

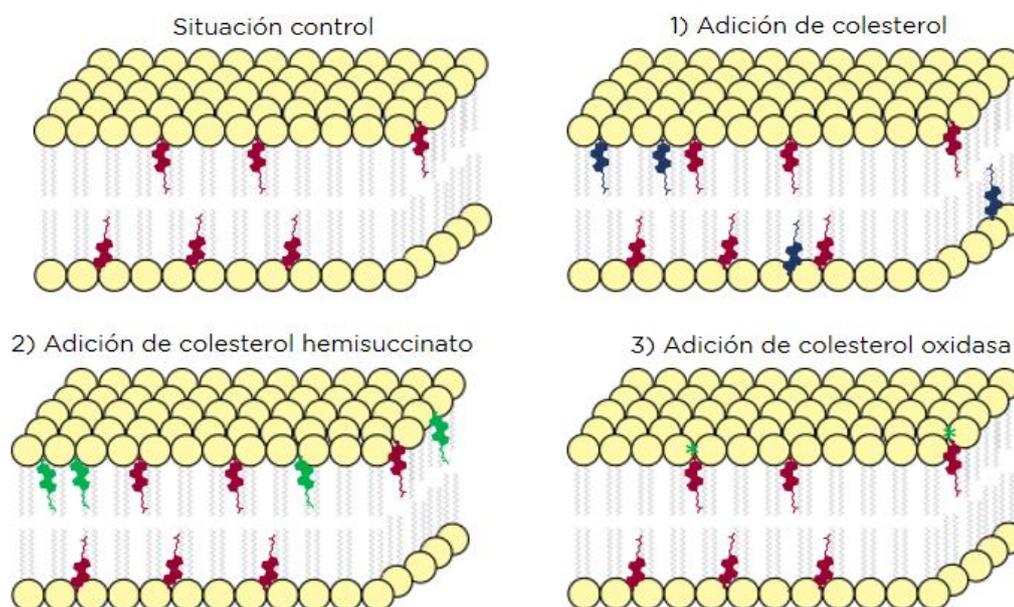


**Figura 18.** Esquema representativo de la transfección por el método de fosfato de calcio.

## 2.5. MODIFICACIÓN DEL COLESTEROL DE MEMBRANA

Una vez obtenidos los distintos sistemas de estudio (GUVs, LUVs, membranas ricas en nAChR o cultivos celulares) se realizaron alteraciones de su composición lipídica, centrándonos en el contenido de Col, a fin de generar asimetrías transbicapa o perturbaciones de las asimetrías laterales (Figura 19).

- ENRIQUECIMIENTO EN COLESTEROL O COLESTEROL HEMISUCCINATO. Se agregó una alícuota de una solución etanólica de Col o colesterol hemisuccinato (CHEMS) a las distintas muestras (el agregado de solvente orgánico fue en todos los casos menor al 0,1 % v/v). La incubación se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- TRATAMIENTO CON COLESTEROL OXIDASA. Se utilizó la enzima Cox (*Cholesterol Oxidase from Streptomyces sp.* (Sigma)) en una relación de 5 unidades cada 100 µl de solución de liposomas, proteoliposomas, GUVs, o DMEM en el caso de incubación de células, y se realizó una incubación de al menos 30 minutos a temperatura ambiente.



**Figura 19.** Esquemas representativos de las perturbaciones de membrana generadas a partir de los distintos tratamientos utilizados para modificar el Col de membrana.

## 2.6. SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE MEMBRANA SEGÚN LA SOLUBILIDAD EN DETERGENTES

Para la obtención de fragmentos de membranas resistentes (DRM, *detergent-resistant membranes*) y solubles (DSM, *detergent-soluble membranes*) a detergentes, los cuales corresponden a fracciones Lo o Ld, respectivamente, se siguió la metodología descrita en trabajos anteriores (Gandhavadi *et al.*, 2002; Bermúdez *et al.*, 2010). Se incubaron 200 µg de nAChR purificado y reconstituido en vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) con una solución de 1 % de Tritón X-100 durante 20 minutos a 4 °C con agitación cada 5 minutos. La muestra se centrifugó luego a 50000 rpm y 4 °C durante 4

horas utilizando el rotor TLA 100.4 en una ultracentrífuga Beckman Coulter TLX. El sobrenadante (fracción DSM) y el *pellet* (fracción DRM) obtenidos se separaron. La fracción DRM fue resuspendida en BD para llevarla a igual volumen que la fracción DSM. Las fracciones DRM y DSM fueron conservadas a -20 °C hasta su uso.

## **2.7. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE HOJAS DE *C. sinensis***

### 2.7.1. EXTRACTOS METANÓLICOS

Las hojas secas de las distintas especies de plantas utilizadas fueron trituradas en un homogeneizador Virtis. A 3 gramos del polvo obtenido se le agregaron 100 ml de la mezcla metanol:agua (80:20) y se lo dejó agitando durante toda la noche a temperatura ambiente. Los extractos fueron luego filtrados y conservados a 4 °C.

### 2.7.2. FRACCIONES AISLADAS A PARTIR DEL EXTRACTO METANÓLICO

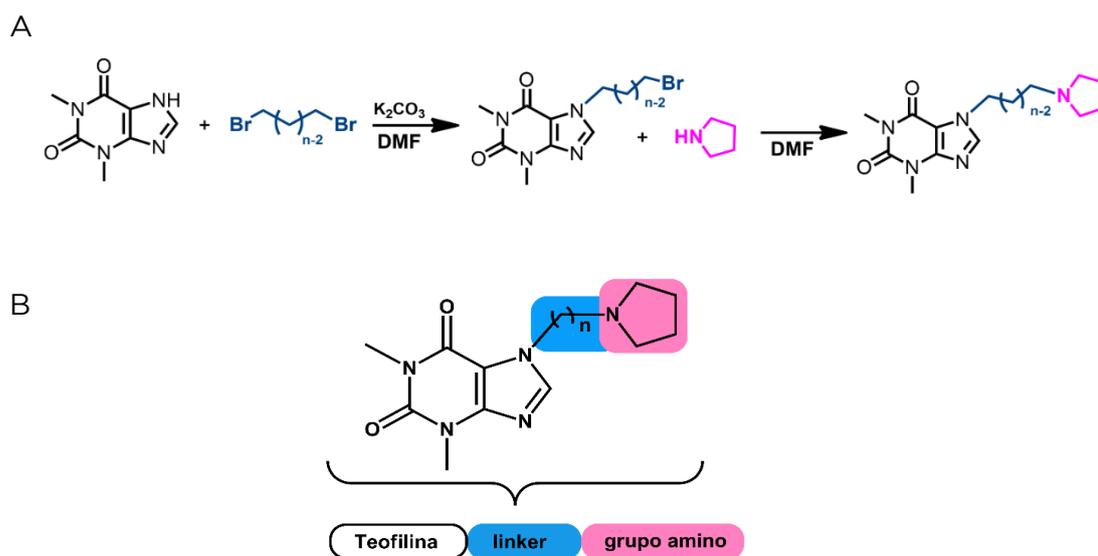
Los procesos de fraccionamiento involucran la separación de metabolitos de mezclas de naturaleza química compleja para obtener fracciones de compuestos con propiedades fisicoquímicas afines. A partir del extracto obtenido con las hojas secas trituradas de *C. sinensis* se realizaron extracciones secuenciales con solventes de polaridad creciente, en el siguiente orden: hexano, diclorometano (DCM), acetato de etilo y butanol. En un primer paso se preparó un extracto a partir de 25 gr de hojas trituradas con 150 ml de metanol absoluto, por agitación durante 10 minutos y posterior filtración. El procedimiento se repitió 3 veces. A continuación, los 450 ml de extracto metanólico se colocaron en un balón en un rotavapor BUCHI (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza) con baño de temperatura a 45 °C y se dejaron evaporar en su totalidad. El extracto se resuspendió con 70 ml de metanol:agua (1:2). Del extracto de metanol:agua se tomó una muestra de 1 ml para posterior análisis y el resto se transfirió a una ampolla de decantación, donde se realizaron las particiones sucesivas con los diferentes solventes. De cada solvente se agregaron 70 ml y luego de agitar y dejar decantar, se recuperó la fracción de interés. Este procedimiento se repitió 3 veces y los 210 ml obtenidos se llevaron a evaporación total en el rotavapor. Los extractos se resuspendieron con 25 ml del solvente puro respectivo y fueron conservados a 4 °C hasta su uso.

## **2.8. OBTENCIÓN DE ANÁLOGOS DE CAFEÍNA**

La síntesis de los análogos de cafeína se realizó en el laboratorio de la Dra. Ana Paula Murray (Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur) junto con la Dra. Brunella Biscussi. Se diseñaron análogos que tuvieran características propias de la cafeína

(esqueleto de teofilina) y de la molécula de nicotina (amina terciaria), la cuál actúa como agonista del nAChR. Los compuestos sintéticos estuvieron formados por una cadena hidrocarbonada de longitud variable (3-7 átomos de carbonos) unidos en un extremo a la molécula de teofilina y en el otro a la de pirrolidina (amina terciaria) (Figura 20).

Para la obtención de los compuestos iniciales, en un tubo de vidrio de reacción de microondas se colocó 1 mmol del compuesto teofilina disuelto en 1 ml de dimetilformamida (DMF) seca, se agregaron 3 mmol de  $K_2CO_3$  y luego 2 mmol de  $\alpha,\omega$ -dibromoalcano. Se utilizaron alcanos de diferente longitud (de 3 a 7 carbonos) para obtener distintos compuestos iniciales. El tubo fue colocado en el equipo de microondas a 150W y 80 °C por 10 minutos. La obtención del producto fue confirmada por TLC. El solvente fue evaporado bajo presión reducida y el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria y mezclas de  $CH_2Cl_2$ /metanol (85:15). Para la obtención de los análogos de la cafeína a partir de los compuestos iniciales, en un tubo de reacción para microondas se agregó una solución de cada uno de los compuestos iniciales obtenidos (0,1 mmol) en DMF seca (1 ml), y se añadió la pirrolidina (0,3 mmol). El tubo de vidrio fue colocado en el equipo de microondas a 150W y 100 °C durante 5-13 minutos hasta observar su conversión total mediante TLC. La mezcla fue particionada en una mezcla de agua y acetato de etilo. La capa orgánica separada fue secada sobre  $MgSO_4$  anhidro y filtrada. El solvente fue evaporado a presión reducida para dar los compuestos finales con una cadena intermedia de 3 a 7 carbonos, a los que denominamos C3-C7.



**Figura 20.** Síntesis química de los análogos de la cafeína. A) Esquema del procedimiento de preparación de los compuestos derivados. B) Esquema representativo de los análogos de la cafeína obtenidos.

### 3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

#### 3.1. CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR EL MÉTODO DE LOWRY

Para cuantificar la proteína obtenida (nAChR) se utilizó el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se realizó una curva de calibrado con albúmina sérica bovina (concentración 1 µg/µl) tomando distintas alícuotas (de 5 a 150 µl). Los volúmenes de las muestras a cuantificar variaron según se tratara de membranas crudas (10 y 50 µl), membranas nativas ricas en nAChR (25 y 50 µl) o nAChR purificado (50 y 100 µl). Tanto a las alícuotas de albúmina como a las de las muestras se les agregó hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N obteniéndose un volumen final de 200 µl para producir la desnaturalización de las proteínas. Esta reacción se dejó reposando por 15 minutos. Luego se agregó 1 ml de una solución formada por 1 parte de tartrato de sodio y potasio 2 % y sulfato de cobre (Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 %, y 49 partes de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 % (p/v) y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se agregaron 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y se realizó otra incubación durante media hora. Las absorbancias tanto de la curva de calibrado como de la muestra se determinaron a una longitud de onda de 750 nm.

#### 3.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

Las muestras obtenidas luego de la separación en fracciones DRM y DSM se incubaron con ácido tricloroacético (TCA) al 20 % durante 45 minutos en hielo y se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos en una microcentrífuga de mesa refrigerada (Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Descartado el sobrenadante, al *pellet* obtenido se le realizaron dos lavados con 1 ml de acetona, y se lo centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos luego de cada lavado. A continuación, luego de dejar evaporar la acetona remanente, el sedimento se resuspendió en *Buffer* Laemmli 2X (Laemmli., 1970) (Tris-Cl 50 mM, DTT 100 mM, docedilsulfato sódico (SDS) 2 %, azul de bromofenol 0,1 %, glicerol 10 %, pH 6,8). La muestra disuelta se desnaturalizó calentando a 100 °C durante 5 minutos (Bermúdez *et al.*, 2010; Perillo *et al.*, 2016). Se preparó un gel de poliacrilamida al 10 % con SDS en el que se corrieron posteriormente las muestras. Éste consistió en un gel de corrida, inferior (Acril-Bis 30 %, *Buffer* Tris 1,5 M pH 8,8, SDS 10 %, persulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 10 %, N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED) 0,04 %), y un gel concentrador (*stacking gel*), superior (Acril-Bis 30 %, *Buffer* Tris 1 M pH 6,8, SDS 10 %, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 10 %, TEMED 0,04 %).

Las muestras se sembraron en las diferentes calles del *stacking gel*. La corrida se realizó a 70 V. El gel se reveló utilizando Coomassie Blue (Coomassie Blue R 0,025 % (disuelto en metanol), metanol 23 % (v/v), ácido acético 9,2 % (v/v) y H<sub>2</sub>O) durante toda la noche a temperatura ambiente y se decoloró posteriormente con una solución metanol:ácido acético:H<sub>2</sub>O 1:1,5:17,5 hasta visualizar las bandas de proteína. La distribución proteica entre las distintas bandas en los geles se analizó utilizando el programa ImageJ (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD).

### 3.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

Las muestras de liposomas obtenidos luego de los respectivos tratamientos lipídicos fueron secadas bajo N<sub>2</sub> y retomadas en 10 µl de cloroformo para realizar luego una cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*). Se sembraron 0,1 µmoles de cada una de las muestras para garantizar su visualización, además de los estándares correspondientes. Para la corrida de las placas se utilizaron dos sistemas de solventes diferentes. En primer lugar se utilizó cloroformo:metanol:amoníaco (65:25:4, v/v/v), que se dejó correr hasta aproximadamente la mitad de la placa y permitió separar de esa forma la fosfatidilcolina (PC) de la SM. Luego del secado de la placa se utilizó como segundo sistema de solventes hexano:éter (60:40, v/v), que se dejó correr hasta el final de la placa y permitió la resolución de los esteroides. Para la visualización y posterior análisis de los lípidos, las placas fueron rociadas con una solución acuosa de 3 % p/v de acetato cúprico y 8 % v/v de ácido fosfórico, y luego calentadas. Se realizó un análisis semi-cuantitativo de los resultados obtenidos utilizando el programa Image J 1.43u (NIH, USA).

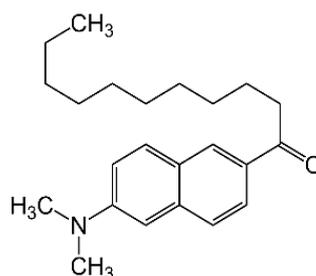
### 3.4. MEDICIONES DE FLUORESCENCIA

Los liposomas, las membranas ricas en nAChR, los proteoliposomas de nAChR o las células expresando el receptor α7 neuronal se resuspendieron en *Buffer A* (NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,25 mM y *Buffer HEPES* 20 mM, pH 7,4). Para las membranas ricas en nAChR y los proteoliposomas se utilizó una concentración final de 100 µg de proteína/ml y 20 µg de proteína/ml, respectivamente; para liposomas de sólo lípido se utilizó la misma concentración de lípidos que la utilizada en los proteoliposomas; y para mediciones con células se prepararon suspensiones por disgregación mecánica de las monocapas con una densidad óptica ~ 0.1. Los estudios fluorimétricos se realizaron en un espectrofluorímetro SLM modelo 4800 (SLM Instruments, Urbana, IL, E.E.U.U.) utilizando un rayo de luz polarizada verticalmente generado a partir de una lámpara de arco de mercurio/xenón obtenido con un polarizador Glan-Thompson (ranuras de excitación y emisión de 4 nm).

Las mediciones se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 o de 0,7 cm de paso de luz (volumen utilizado en cada caso: 2 ml o 800  $\mu$ l, respectivamente), dependiendo del experimento. En los casos en que fue requerido, la temperatura se reguló con un baño termostatzado de circulación de agua (Haake, Darmstadt, Alemania).

### 3.4.1. MEDICIÓN DE LA POLARIZACIÓN GENERALIZADA

Para este estudio se utilizó la sonda fluorescente Laurdan (Figura 21). El Laurdan posee un gran momento dipolar, lo que resulta en su capacidad para reportar la cantidad de moléculas de agua de su entorno (Parasassi *et al.*, 1990). El momento dipolar del Laurdan se incrementa al excitar a la molécula y genera la reorientación de los dipolos de las moléculas del solvente (en este caso, del agua). La energía requerida para la reorientación del solvente disminuye el estado de energía excitado, lo que se refleja en un cambio del espectro de emisión del Laurdan. La cantidad de agua en la membrana ha sido de esta manera correlacionada con el empaquetamiento lipídico y la fluidez de la misma.



**Figura 21.** Estructura química del Laurdan.

Las muestras de liposomas o de membranas ricas en nAChR se marcaron con Laurdan. A cada muestra se le agregó una solución de la sonda fluorescente disuelta en etanol de manera tal de obtener una concentración final de sonda de 0,6  $\mu$ M (la concentración de solvente orgánico fue en todos los casos menor al 0,1 % v/v). Las muestras se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 45 minutos. Tanto a los liposomas como a las membranas ricas en nAChR se les realizaron luego los tratamientos correspondientes para generar los cambios lipídicos deseados y se incubaron durante al menos 15 minutos antes de efectuar las mediciones de fluorescencia.

Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia de la sonda Laurdan mediante la excitación directa de la sonda (longitud de onda de excitación de 360 nm). Con cada uno de estos espectros se calculó un valor de polarización generalizada (*GP*) utilizando la siguiente fórmula:

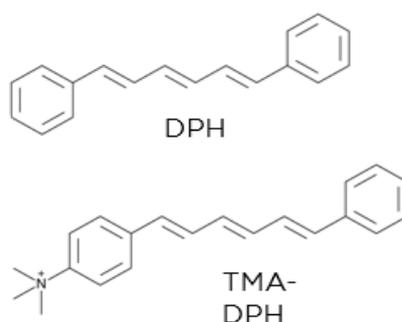
$$GP = \frac{I_{434} - I_{490}}{I_{434} + I_{490}}$$

donde  $I_{434}$  y  $I_{490}$  son las intensidades de emisión de la sonda a las longitudes de onda características de las fases gel y líquido-cristalina, respectivamente (Parasassi *et al.*, 1990, 1991).

Los valores de  $GP$  pueden variar entre -0,2 y 0,6. Un valor alto de  $GP$  se asocia con una baja fluidez, baja polaridad y/o alto contenido de Col en las membranas, lo que indica un mayor orden de membrana. Un valor bajo de  $GP$  indica lo contrario, es decir, un mayor desorden de la membrana (Yu *et al.*, 1996).

### 3.4.2. MEDICIÓN DE LA ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA

Para los estudios de anisotropía se utilizaron las sondas fluorescentes DPH, la cual se localiza en el centro hidrofóbico de la membrana, y TMA-DPH, la cual se localiza en la bicapa externa (interfase agua/bicapa) y permite de esta forma sensar las regiones superficiales más ordenadas de la membrana (Figura 22).



**Figura 22.** Estructura química del DPH y del TMA-DPH.

La anisotropía de fluorescencia se produce cuando la luz que emite un fluoróforo posee diferentes intensidades en diferentes ejes de polarización. Cuando se aplica luz polarizada a un grupo de fluoróforos (en este caso DPH y TMA-DPH) orientados al azar, la mayor parte de las moléculas que se excitan van a ser las que se encuentren orientadas dentro de un rango específico de ángulos con respecto a la polarización aplicada. Si estas moléculas no se mueven, la luz que emitan va a ser paralela a la de excitación (anisotropía intrínseca =  $r_0$ ). Cuando el fluoróforo, en cambio, tiene la posibilidad de cambiar su

orientación antes de emitir fotones, la luz emitida va a tener una dirección diferente a la de excitación y entonces el grado de polarización de la luz emitida se reduce.

Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 365 y 425 nm, respectivamente. Las mediciones de fluorescencia para calcular la anisotropía ( $r$ ) se realizaron en un formato T con filtros Schott KV418 en los canales de emisión. El valor de  $r$  se obtuvo según la siguiente fórmula (Shinitzky y Yuli, 1982):

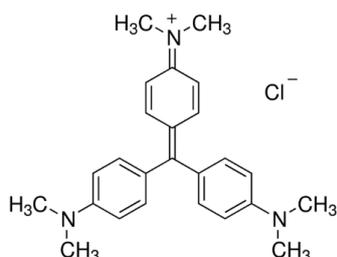
$$r = \frac{(I_v / I_h)_v - (I_v / I_h)_h}{(I_v / I_h)_v + (I_v / I_h)_h}$$

donde  $(I_v / I_h)_v$  y  $(I_v / I_h)_h$  son la relación entre la luz emitida vertical u horizontalmente polarizada y la luz de excitación vertical u horizontalmente polarizada, respectivamente. En sistemas biológicos el valor de  $r$  puede variar entre -0,2 y 0,4, donde los valores más altos denotan un orden estructural de los lípidos mayor (Lakowicz *et al.*, 1983).

Para estos experimentos, los liposomas se marcaron con la sonda fluorescente DPH o con la sonda TMA-DPH. A cada muestra se le agregó una alícuota de una solución de DPH o de TMA-DPH disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración final de 0,6  $\mu$ M (la concentración de solvente orgánico fue en todos los casos menor al 0,1 % v/v), (Antollini y Barrantes, 1998; Perillo *et al.*, 2012). Las muestras fueron incubadas en la oscuridad a temperatura ambiente por al menos 20 minutos. Luego, los liposomas fueron tratados de la manera correspondiente para generar los cambios lipídicos deseados y se incubaron durante al menos 15 minutos más antes de realizar las mediciones de fluorescencia.

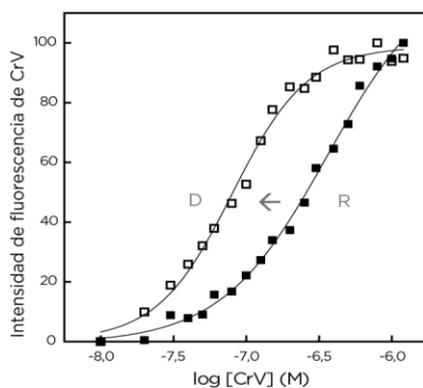
### 3.4.3. MEDICIONES DE FLUORESCENCIA CON CRISTAL VIOLETA

El colorante fluorescente CrV (Figura 23), perteneciente a la familia de compuestos amino-triarilmetano, se comporta como un bloqueador del canal iónico del nAChR cuando este se encuentra en el estado abierto (bloqueador de canal abierto) y posee una alta afinidad por el nAChR en su estado desensibilizado (Lurtz y Pedersen, 1999).



**Figura 23.** Estructura química del CrV.

Las suspensiones de membranas ricas en nAChR en *Buffer A* (100  $\mu\text{g}$  de proteína/ml) fueron tratadas para generar los cambios lipídicos correspondientes o incubadas durante 15 minutos con los compuestos a testear. A continuación, para determinar las posibles alteraciones funcionales del nAChR, se evaluó la capacidad de la carbamilcolina (carb, agonista del nAChR) de generar un cambio conformacional del nAChR desde el estado de reposo (R), de baja afinidad por el CrV, a un estado desensibilizado (D), de alta afinidad por el CrV (Lurtz y Pedersen, 1999). Para tal fin, posteriormente a los tratamientos, las membranas ricas en AChR de *T. californica* se incubaron con 1 mM de carb durante 15 minutos. Se realizó luego una titulación de las membranas con concentraciones crecientes (desde 5 nM a 1400 nM) de CrV disuelto en *Buffer A*. Luego de cada agregado de CrV, las muestras se incubaron por 15 minutos y se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia del CrV. La longitud de onda de excitación fue 600 nm y los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron desde 605 a 700 nm. A cada espectro de fluorescencia obtenido se le restó la fluorescencia inespecífica previa al agregado de CrV. Para determinar las constantes de disociación ( $KD$ ) del CrV del nAChR se midió la intensidad máxima de CrV (a 623-625 nm) de cada uno de los espectros y se graficaron los valores en función de la concentración molar del CrV agregado. La curva sigmoidea resultante se ajustó con la función de Boltzmann y se calcularon los valores de  $KD$  (Fernández Nieves *et al.*, 2008) (Figura 24).



**Figura 24.** Gráfico representativo de las curvas obtenidas para el nAChR en estado D y R luego de la titulación con CrV.

### 3.4.3. MEDICIONES CON $\alpha$ -BUNGAROTOXINA FLUORESCENTE

La  $\alpha$ -BTX es un antagonista de los nAChRs, a los cuales se une de forma irreversible y competitiva. Al estar conjugada con la sonda Alexa-488, es posible relacionar la intensidad de fluorescencia con la cantidad de sitios de unión de  $\alpha$ -BTX sobre el nAChR.

En los estudios realizados con membranas ricas en AChR de *T. californica*, se preparó una suspensión de membranas en *buffer* A en una concentración de 100  $\mu$ g proteína/ml. En los estudios realizados con células BOSC 23 que expresaban el receptor  $\alpha$ 7 neuronal, estas se resuspendieron en PBS (Bouzat *et al.*, 1994; Corradi *et al.*, 2007). En ambos casos se realizó una incubación durante 20 minutos con concentraciones crecientes de cafeína (0,1, 0,3, 1, 5 o 10 mM), con galantamina (0,3 y 1 mM) o con carb (10mM). Cada condición fue luego incubada con 10 nM de Alexa 488- $\alpha$ BTX durante 30 minutos. La unión de  $\alpha$ -BTX al AChR fue finalizada por centrifugación a 12000 rpm durante 1 minuto, la cual se repitió 3 veces. Las muestras fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS. La bungarotoxina fluorescente Alexa 488- $\alpha$ BTX fue excitada a 488 nm, y el espectro de emisión se colectó desde 500 a 600 nm. Se obtuvo, en primer lugar, una emisión de fluorescencia basal en ausencia de toxina fluorescente, cuyo valor fue luego restado a cada espectro de emisión obtenido en presencia de Alexa 488- $\alpha$ BTX y se tomó la intensidad máxima a 520 nm.

### 3.5. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE MISCIBILIDAD DE GUVs

GUVs de DOPC:Col:eSM (1:1:1), conteniendo o no el péptido  $\gamma$ TM4 (L:P 250:1), fueron colocados en una cámara conectada a un termostato, a la que se le controló la temperatura mediante circulación de agua (Kubsch *et al.*, 2016, 2017). La temperatura inicial fue seteada a 22 °C, temperatura a la cual todas las vesículas presentaron separación de fases y fue incrementándose de a 2 °C. Los GUVs fueron incubados por 3 minutos una vez alcanzada la temperatura deseada, y luego se contó la cantidad de vesículas con separación de fases de un total de 100 vesículas cada vez. La fracción de vesículas homogéneas a cada temperatura fue graficada en función de la temperatura (°C) y ajustada a un modelo sigmoideo de Boltzmann. Dado que existe un comportamiento sigmoideo, se consideró como 0 (el número de vesículas homogéneas) a temperaturas inferiores a 22 °C, y como 1 a todas las temperaturas mayores a la temperatura en la cual se observaron sólo vesículas sin separación de fases.

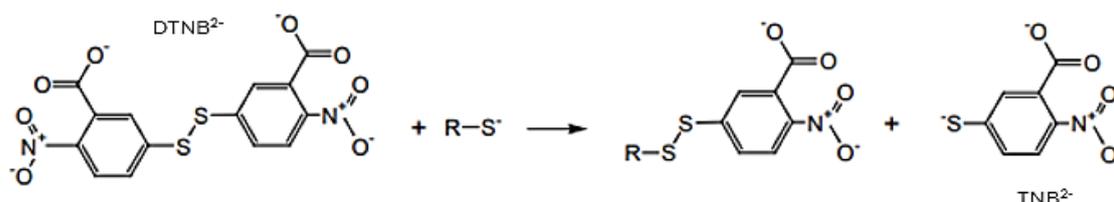
### 3.6. RECUPERACIÓN DE LA FLUORESCENCIA TRAS FOTOBLANQUEO (FRAP) EN GUVs

Las mediciones de FRAP fueron hechas en los dominios desordenados de GUVs de DOPC:Col:eSM (1:1:1) en tres condiciones diferentes: i) vesículas sin el péptido  $\gamma$ TM4, ii) vesículas con  $\gamma$ TM4 (L:P 250:1), y iii) vesículas con  $\gamma$ TM4 (L:P 125:1), utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP8 con un objetivo de inmersión en agua HC PL APO CS2 63x/1,20. Se registraron imágenes de 256 x 256 píxeles a 1000 Hz. La sonda DiI-C18 fue excitada con un láser de 561 nm, y la señal de fluorescencia fue colectada a 567-606 nm. El tamaño de la apertura fue de 1 disco de Airy. El fotoblanqueo se llevó a cabo a 505 ms a una intensidad del láser del 100 % utilizando una región circular de interés (ROI) con un radio nominal  $r_n = 2,5 \mu\text{m}$ . El coeficiente de difusión, D, fue calculado como  $D = \frac{r_e^2 + r_n^2}{8t_{1/2}}$ , donde  $r_e$  y  $r_n$  son el radio efectivo y el radio nominal, respectivamente, y  $t_{1/2}$  es el tiempo medio de recuperación de fluorescencia del DiI-C18 (Kang *et al.*, 2012).

### 3.7. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA

La actividad de ACE fue determinada utilizando el método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961). La enzima ACE hidroliza la ACh, lo que resulta en la formación del producto tiocolina, la cual reacciona con el reactivo de Ellman (5,5-ditiobis-(2-ácidonitrobenzoico), DTNB) produciendo un disulfuro mixto y ácido 5'-tio-2-nitro-benzoico (TNB), un producto amarillo que puede ser detectado a 405 nm (Figura 25).

El DTNB fue disuelto en *buffer* fosfato pH 7 conteniendo  $\text{NaHCO}_3$  para obtener una solución stock que fue diluida al momento de su uso con *buffer* fosfato pH 8 para obtener DTNB 0,25 mM. La reacción enzimática fue iniciada por el agregado de 20  $\mu\text{l}$  de acetiltiocolina 75 mM, cuya hidrólisis fue cuantificada mediante la medición de valores de absorbancia a 405 nm cada 10 segundos durante 180 segundos.



**Figura 25.** Reacción colorimétrica mediante el método de Ellman. El DTNB reacciona con un tiol, en este caso de la tiocolina, dando como productos de reacción un disulfuro mixto y TNB<sup>2-</sup>.

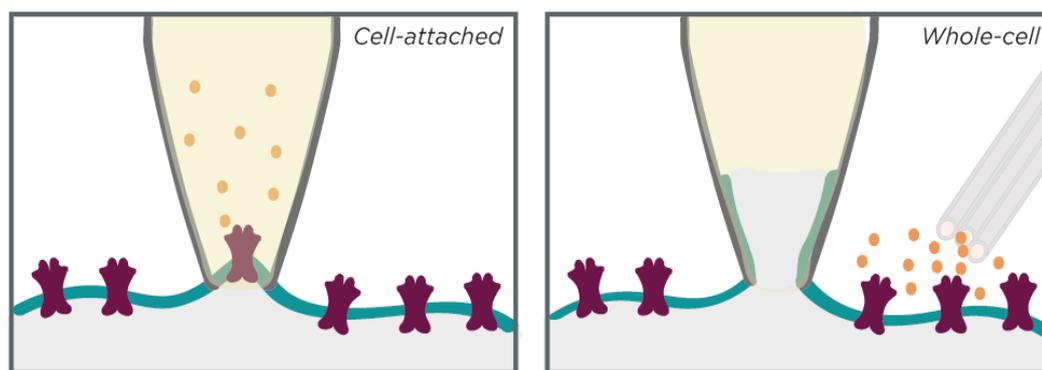
Para determinar el IC<sub>50</sub> (concentración a la cual se observa un 50 % de hidrólisis del sustrato), los valores correspondientes a los porcentajes de hidrólisis obtenidos inmediatamente luego del agregado de acetilcolina fueron graficados en función del logaritmo de la concentración de los extractos o los compuestos estudiados. La curva sigmoidea resultante fue ajustada utilizando la función de Boltzmann, obteniéndose el valor de IC<sub>50</sub> para cada situación experimental.

### **3.8. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS DE *C. sinensis***

La identificación del compuesto activo presente en el correspondiente sub-extracto se realizó en el laboratorio de la Dra. Ana Paula Murray (Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur). Luego de realizado el fraccionamiento bioquímico de un extracto de *C. sinensis* con solventes de polaridad creciente (hexano, DCM, acetato de etilo y butanol), se conservó el subextracto que mostró actividad y se lo sometió a una columna cromatográfica de Silica gel 60 (70x230 mesh, Merck). Entre las fracciones obtenidas, solo una mostró actividad sobre la ACE. A dicha fracción activa se le realizó luego una separación por TLC. La cromatografía fue realizada en hojas de Silica gel 60 F524 (0,2mm de ancho, Merck) y las bandas fueron detectadas utilizando p-anisaldehído-acético. La caracterización de la estructura del compuesto activo aislado fue realizada por espectroscopía NMR. Los espectros de NMR fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker ARX300 (300 MHz y 75 MHz para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C respectivamente). Se utilizó como solvente CDCl<sub>3</sub> con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

### **3.9. EXPERIMENTOS DE ELECTROFISIOLOGÍA**

Para obtener registros de canal único (en la configuración *cell-attached*) o de corrientes macroscópicas (en la configuración *whole-cell*) por medio de la técnica *patch-clamp*, se utilizaron células BOSC 23 expresando los nAChRs muscular o neuronal α7, o el receptor 5HT<sub>3A(HC)</sub>, 2 o 3 días luego de haber sido transfectadas con las subunidades correspondientes (Figura 26).



**Figura 26.** Detalle de las distintas configuraciones utilizadas en la técnica de *patch clamp*. Los círculos naranjas representan las moléculas de agonistas y/o moduladores empleados.

### 3.9.1. REGISTROS DE CANAL ÚNICO

Los registros de canal único fueron obtenidos en la configuración *cell-attached*. La composición del *buffer* extracelular fue: KCl 142 mM, NaCl 5,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,7 mM y HEPES 10 mM, con un pH de 7,4 cuando se trabajó con nAChR, y KCl 142 mM, NaCl 5,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.2 mM y HEPES 10 mM con un pH de 7,4 cuando se trabajó con el receptor 5-HT<sub>3AHC</sub>.

Las soluciones de pipeta fueron preparadas en el mismo *buffer* extracelular, y contuvieron los agonistas y/o compuestos a probar. Todos los registros de canal único fueron obtenidos a temperatura ambiente y a un potencial de membrana de -70 mV. Para esto se utilizó un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices Corp, CA), los registros fueron digitalizados a intervalos de 5  $\mu$ s y 200 kHz y filtrados a una frecuencia de 10 kHz mediante una interfaz Instrutech ITC-18 (HEKA Instruments Inc.). Los registros fueron adquiridos mediante el software Acquire (Bruzton Corp, Seattle, WA).

Los registros obtenidos fueron idealizados utilizando el programa QuB 2.0.0.28 ([www.qub.buffalo.edu](http://www.qub.buffalo.edu)), con la aplicación previa de un filtro digital de 9 kHz (o 3 kHz en los registros en los cuales se había utilizado PNU) para facilitar el análisis. Los eventos de apertura y cierre de los canales se detectaron e idealizaron mediante el criterio del umbral de amplitud media. A partir de ellos, se obtuvieron histogramas de tiempos de estados abiertos y cerrados. Para la obtención de las duraciones de dichos tiempos se utilizó el método del intervalo de la máxima probabilidad (función MIL, *maximum interval likelihood*) del programa QuB, el cual, en base a un modelo cinético, aproxima las curvas teóricas que mejor representen los histogramas experimentales (Qin *et al.*, 1997, 1996). Para este ajuste se fijó un valor de duración mínima detectable, o *dead time*, de 0,03 ms para el nAChR muscular y el receptor 5-HT<sub>3AHC</sub>, y de 0,03 ms o 0,1 ms para el nAChR

neuronal  $\alpha 7$  en ausencia o presencia de PNU, respectivamente. Para el receptor muscular, el mejor ajuste fue obtenido con el modelo cinético clásico reportado previamente (Bouzat *et al.*, 1994; Corradi *et al.*, 2007). Para el receptor  $\alpha 7$ , este análisis fue realizado agregando secuencialmente un estado abierto y/o cerrado a un modelo inicial cerrado  $\rightleftharpoons$  abierto de modo de lograr la mejor aproximación del histograma experimental correspondiente. Los modelos obtenidos para este receptor contaron con 4 o 5 estados cerrados y 2 o 3 estados abiertos cuando los registros fueron obtenidos con ACh o cafeína como agonista y PNU como modulador, o 3 estados cerrados y 1 o 2 estados abiertos cuando los registros fueron obtenidos en presencia de acetilcolina o cafeína y en ausencia de PNU (Bouzat *et al.*, 2008; daCosta y Baenziger, 2009). Para el receptor de serotonina, el mejor ajuste fue obtenido en todos los casos con el modelo cinético reportado previamente para el receptor 5-HT<sub>3A</sub> de ratón (Corradi *et al.*, 2014).

Los *clusters* fueron identificados como una serie de eventos de apertura sucesivos de una misma molécula de receptor separadas por cierres breves, precedidos y seguidos por cierres más largos que una duración crítica ( $\tau_{crit}$ ). Las duraciones críticas calculadas a partir de la función MIL fueron diferentes para cada uno de los receptores estudiados. Los tiempos críticos obtenidos para el receptor muscular (intersección entre el segundo y el tercer componente del histograma de estados cerrados) fueron de aproximadamente 15 ms, mientras que los obtenidos para el receptor neuronal  $\alpha 7$  en presencia de PNU (intersección entre el tercer y el cuarto componente) fueron de aproximadamente 60 ms. Para el receptor de 5-HT<sub>3</sub>, los tiempos críticos obtenidos (intersección entre el tercer y el cuarto componente cerrado) fueron de aproximadamente 20 ms.

### 3.9.2. REGISTROS DE CORRIENTES MACROSCÓPICAS

Las corrientes macroscópicas se obtuvieron en la configuración de célula entera o *whole-cell*. La composición del *buffer* de pipeta (intracelular) fue: KCl 134 mM, HEPES 10 mM, EGTA 5 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM con un pH de 7,4. La solución extracelular contenía: NaCl 150 mM, HEPES 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM y MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM con un pH de 7,4 para los casos en que se trabajó con el nAChR, y NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM y HEPES 10 mM con un pH de 7,4 cuando se trabajó con receptor 5HT<sub>3AHC</sub>.

Para realizar los experimentos se utilizó un sistema de perfusión formado por reservorios que contenían las soluciones, válvulas de control manual, un controlador de válvulas de 4 canales (ALA, *Scientific System*) y tres tubos de silicona (diámetro interno 0,3 mm, *Cole-Parmer*) colocados dentro de la cápsula y orientados hacia la célula (Liu and Dilger, 1991; DaCosta *et al.*, 2011).

Los registros se obtuvieron empleando los mismos instrumentos que en la configuración *cell-attached*, a un potencial de membrana de -50 mV, filtrándose a 5 kHz y digitalizándose a 20 kHz. Los tiempos de activación de las distintas válvulas y la adquisición de las señales de corrientes macroscópicas se realizaron mediante el programa WinWCP 5.3.2 (University of Strathclyde, Glasgow, Escocia) y se analizaron empleando el programa Clampfit 10.7.0.3 (Molecular Devices, San José, CA).

A partir de las corrientes macroscópicas obtenidas analizamos el pico de corriente, el *rising time* (que corresponde al tiempo que tarda la respuesta en llegar de un 10 a un 90 % de la respuesta total,  $t_{10-90}$  %), y el tiempo de decaimiento, obtenido por el ajuste de las corrientes con la función:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau_d) + I_\infty$$

donde  $I_0$  e  $I_\infty$  corresponden a los valores del pico y del estado basal (en pA), respectivamente, y  $\tau_d$  es la constante del tiempo de decaimiento (en ms).

### 3.10. MODELADO MOLECULAR Y DOCKING

Para los estudios con la ACE se utilizó la estructura 4EY7, que corresponde a ACE humana cristalizada con donepezilo (Cheung *et al.* 2012). Para los estudios con el nAChR de ratón se crearon modelos por homología del dominio extracelular de las subunidades adyacentes correspondientes a los sitios de unión de ACh ( $\alpha 1/\delta$  y  $\alpha 1/\epsilon$ ). Para los modelos correspondientes al receptor con el *C-loop* cerrado se utilizó la estructura del receptor nicotínico humano  $\alpha 4\beta 2$  unido a nicotina (*Protein Data Bank code* -PDB- 5KXI, Morales-Pérez *et al.*, 2016). Para los modelos correspondientes al receptor con el *C-loop* parcialmente cerrado se utilizó la estructura de la quimera  $\alpha 7$ /AChBP (*acetylcholine binding protein*) cristalizada con el agonista parcial lobelina (PDB 5AFM, Spurny *et al.*, 2015). Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas usando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y el modelado fue realizado usando MODELLER 9.19 (<https://salilab.org/modeller/>) (Sali *et al.*, 1995). Cada modelo se evaluó con DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*; Shen y Sali, 2006) y se confirmó que más del 90 % de los residuos se encontraban dentro de las regiones permitidas del correspondiente gráfico de Ramachandran con PROCHECK (Lakowski *et al.*, 1996).

Para realizar el *docking* proteína-ligando se utilizó el programa AUTODOCK 4.2 (Morris *et al.*, 2009). Para los experimentos sobre la estructura de la ACE se definió la región a evaluar con una grilla que abarcó toda la molécula. Para el *docking* sobre los

modelos del receptor nAChR de ratón se definió una grilla de 62x62x62 puntos y 0,375 de espaciado en la región que corresponde al sitio de unión de la ACh en las dos interfases ( $\alpha 1/\delta$  y  $\alpha 1/\epsilon$ ) de forma tal que los residuos reportados como implicados en la unión y activación del receptor quedaran contenidos en la región a evaluar. Se realizaron 3 experimentos de 50 corridas cada uno para cada condición. Las distintas conformaciones obtenidas en cada experimento se agruparon según la similitud estructural en base al valor de desviación cuadrática media de sus átomos con un criterio de corte de 2 Å. La conformación que mejor representó la unión del correspondiente ligando con su sitio de unión fue graficada con Discovery Studio Visualizer 4.5 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, 2016).

### 3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones entre grupos de resultados se realizaron utilizando la prueba estadística de análisis de la varianza unidireccional, conocida como *one-way* ANOVA. En el caso de las mediciones de canal único, el análisis estadístico se realizó utilizando el test de *Student*. Todos los datos están expresados como promedio  $\pm$  desvío estándar (D.S.) de experimentos independientes. “\*” =  $p < 0,05$ ; “\*\*” =  $p < 0,001$ . Las comparaciones entre dos líneas de datos se realizaron mediante la prueba ANCOVA (análisis de covarianza). Antes de este análisis, se aseguró que la varianza en los dos grupos de datos a comparar fuera la misma. La hipótesis nula estándar establece que para que dos líneas de datos sean iguales, sus pendientes deben ser iguales. De lo contrario, las líneas son diferentes. Aquí, la hipótesis nula fue rechazada con un valor de  $p < 0,05$ . Cuando se encontró que las pendientes eran las mismas, se llevó a cabo una investigación adicional de las diferencias en las medias utilizando la prueba de intersecciones iguales.

# **CAPÍTULO I**

## **Modulación del nAChR muscular por alteraciones en el colesterol de la membrana**

## INTRODUCCIÓN

La interacción lípido-proteína a nivel de membrana es un área importante de investigación dada su implicancia en una enorme cantidad de procesos tanto fisiológicos como patológicos. En particular, la neurotransmisión involucra receptores que son proteínas integrales de membrana, las cuales se encuentran en íntimo contacto con los lípidos que las rodean, como es el caso de los nAChRs.

Los componentes de las membranas biológicas están distribuidos asimétricamente entre las dos hemicapas. Tanto las proteínas como los carbohidratos presentan una asimetría absoluta, mientras que la mayoría de los lípidos están presentes en ambas hemicapas, pero en distintas concentraciones (Rothman y Lenard, 1977; Lin y London, 2014), hecho importante para el correcto funcionamiento celular. La hemicapa externa de la membrana se encuentra principalmente enriquecida en PC y SM, mientras que los lípidos que contienen aminos (como la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilserina (PS)) se encuentran preferentemente en la hemicapa citoplasmática o interna de la membrana celular (Schroit y Zwaal, 1991). El Col, que comprende cerca del 40 mol % de los lípidos de la membrana plasmática (Wood *et al.* 1989), también se encuentra distribuido asimétricamente entre ambas hemicapas. La hemicapa interna, o citoplasmática, de las membranas contiene cerca del 85 % del Col total (Schroeder 1985; Wood *et al.* 2002). Dado que el Col tiene una velocidad de *flip-flop* menor a 1 segundo (Steck *et al.*, 2002), se esperaría que tuviera una distribución simétrica entre ambas hemicapas, pero se ha demostrado que, dependiendo del tipo celular estudiado, el Col se distribuye de manera asimétrica (McIntosh, 2003). Sin embargo, esta distribución depende fundamentalmente de la afinidad del Col por los otros lípidos y proteínas que componen la membrana de cada célula.

A nivel del SNC se ha visto que la composición y organización de las membranas cambia durante el envejecimiento y en distintas patologías. Las primeras evidencias de que la composición lipídica de las membranas en el cerebro cambia a lo largo de la vida de una persona fueron presentadas por Burger y Seidel (Burger y Seidel, 1958) y por Rouser y Yamamoto (Rouser y Yamamoto, 1968). En 1994, Svennerholm y colaboradores analizaron la corteza temporal y frontal y la materia blanca de cerebros obtenidos de sujetos de entre 20 y 100 años que fallecieron de muerte natural. Demostraron una disminución moderada de lípidos, fundamentalmente Col, luego de la segunda década de vida, y cambios más pronunciados a partir de los 80 años. Estos cambios que ocurren en condiciones fisiológicas influyen la transmisión colinérgica alterando la comunicación

sináptica (Svennerholm *et al.*, 1994). Existen además diversos cambios en la composición de las membranas biológicas, así como también en la asimetría de los lípidos de las mismas y en las interacciones entre los lípidos y las proteínas que la componen, que han sido asociados a distintas enfermedades, entre ellas la EA (Fabiani y Antollini, 2019).

En cuanto al nAChR, además de los cambios fisiológicos y/o patológicos mencionados, el entorno lipídico del mismo cambia a lo largo de su tráfico desde las membranas intracelulares, donde es sintetizado, hacia los distintos sitios sinápticos en la membrana plasmática (Baenziger *et al.*, 2015). Además, está ampliamente documentada la dependencia de la presencia de ciertos lípidos en su entorno inmediato, fundamentalmente Col y fosfolípidos aniónicos, para su correcto funcionamiento, y el hecho de que distintas perturbaciones de dicho entorno llevan a alteraciones en la función del receptor (Criado *et al.*, 1984; Fong y McNamee, 1986; Antollini *et al.*, 1996; Baenziger *et al.*, 2000; daCosta y Baenziger 2009; Sturgeon y Baenziger, 2010; daCosta *et al.*, 2013; Baenziger *et al.*, 2017). Es por todo esto que resulta de gran interés conocer cómo la presencia o ausencia y la localización de distintos lípidos afectan tanto la correcta localización de los receptores en la sinapsis como su función.

El estudio de las membranas *in vivo* no es una tarea fácil. Las membranas modelo son consideradas aproximaciones razonables de las membranas celulares y es por eso que se usan como modelo de estudio de las membranas nativas ya que permiten estudiar más fácilmente la organización de las mismas. La posibilidad de reconstituir al nAChR en sistemas modelo de composición lipídica definida permite estudiar la importancia del entorno lipídico sobre la funcionalidad del mismo. Teniendo en cuenta que el nAChR muscular ha sido el modelo para la mayoría de los estudios tanto biofísicos como farmacológicos de toda la familia de receptores nicotínicos, los distintos experimentos en este capítulo se realizaron utilizando el nAChR muscular.

## OBJETIVOS

Conociendo que el nAChR es una proteína transmembrana cuya actividad está íntimamente condicionada por su entorno lipídico, y que durante el envejecimiento y en ciertas patologías neurodegenerativas, tal como la EA, las membranas plasmáticas cambian tanto su composición lipídica como su organización, siendo el Col uno de los lípidos trascendentales en dichos cambios, el **OBJETIVO GENERAL** del capítulo I de la Tesis fue estudiar la influencia de diferentes modificaciones del Col de membrana sobre el nAChR muscular. Dada la complejidad de las membranas celulares, en este capítulo de la Tesis elegimos recurrir a diversos sistemas modelo, reduccionistas, que nos permitieron explorar y entender interacciones intermoleculares específicas.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** del presente capítulo fueron:

- Estudiar en LUVs y en membranas ricas en nAChR de *T. californica* las posibles consecuencias en las propiedades biofísicas de la membrana producidas por alteraciones del Col, ya sea un aumento del mismo, su transformación a colesteno o la incorporación de CHEMS en la hemicapa externa.
- Estudiar en sistemas modelo en presencia de nAChR (membranas ricas en nAChR de *T. californica*) las posibles perturbaciones del equilibrio conformacional del receptor por alteraciones del Col de la membrana.
- Estudiar en líneas celulares que expresan heterológicamente al nAChR muscular las posibles implicancias de alteraciones del Col de la membrana sobre la funcionalidad del mismo.
- Estudiar en sistemas modelo en presencia de nAChR (LUVs con nAChR purificado de membranas de *T. californica*) la distribución, localización o preferencia del nAChR por dominios Lo y/o Ld.
- Para profundizar los resultados obtenidos a partir del objetivo anterior, en este último objetivo nos propusimos utilizar GUVs, sistemas modelo de membrana de tamaño celular (Walde *et al.* 2010; Dimova, 2019), para estudiar mediante microscopía de fluorescencia posibles cambios ocasionados por alteraciones del Col

en la forma, las propiedades mecánicas y las características fisicoquímicas de membranas biológicas, y cómo esto repercute sobre la distribución, localización o preferencia de un péptido sintético representativo del nAChR por dominios Lo y/o Ld.

## RESULTADOS

Con la intención de estudiar la importancia de la presencia y localización del Col de membrana en relación al nAChR, trabajamos con diferentes sistemas modelos a los que enfrentamos a distintos tratamientos a fin de modificar la condición inicial de Col. Los sistemas de estudio utilizados fueron LUVs de solo lípidos o reconstituidos con nAChR purificado, GUVs conteniendo o no un péptido sintético correspondiente al segmento TM4 de la subunidad  $\gamma$  del nAChR, membranas de *T. californica* ricas en nAChR y líneas celulares expresando heterológicamente el nAChR muscular.

A estos sistemas modelo se les realizaron distintos tratamientos:

i) Se aumentó la cantidad de Col en la membrana por incubación de los mismos en una solución conteniendo Col;

ii) Se aumentó la cantidad de esteroides en la membrana por incubación de los mismos en una solución conteniendo CHEMS, molécula similar al Col pero con un grupo succinato cargado negativamente que lo posiciona cerca de la interfase lípido-agua y lo concentra en la hemicapa externa (Kulig *et al.*, 2014);

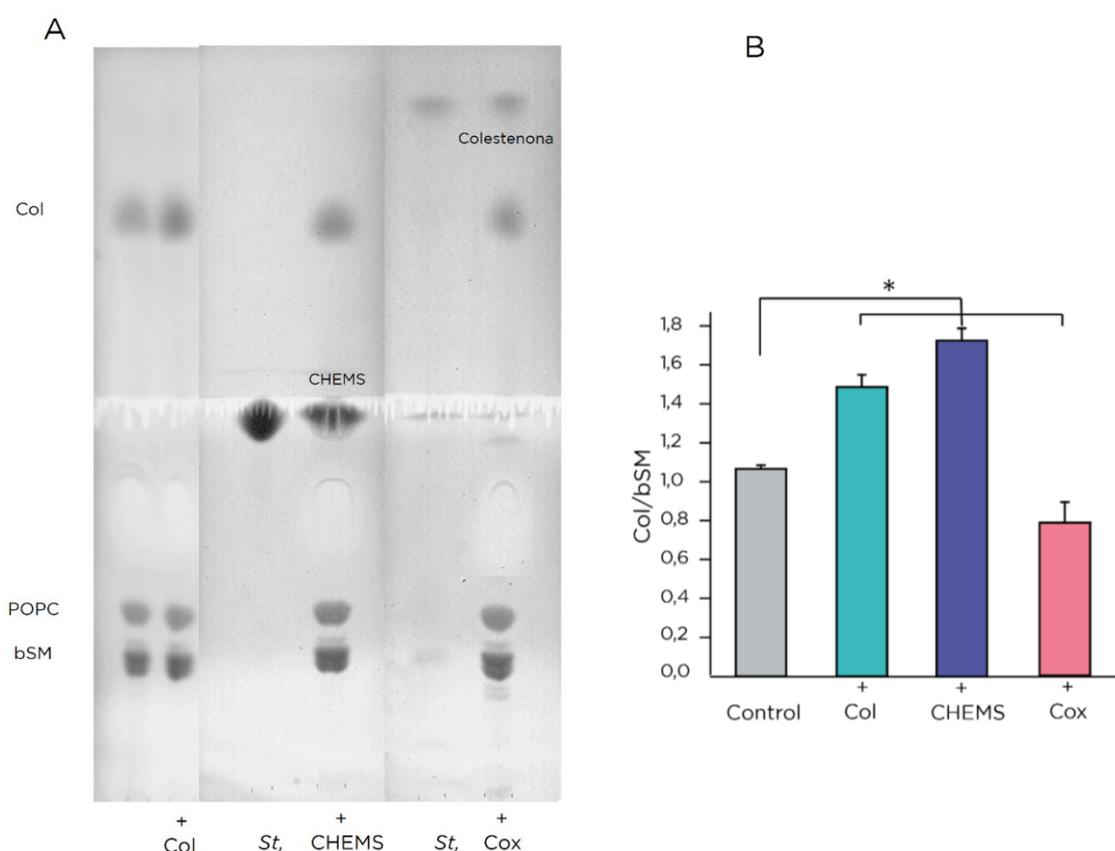
iii) Se oxidó parte del Col de la membrana a colesteno por acción de la enzima colesterol oxidasa (Cox).

### 1. MODIFICACIONES DEL CONTENIDO DE COLESTEROL

Para garantizar que los diferentes tratamientos estuvieran efectivamente produciendo los cambios buscados, comparamos la composición lipídica de los LUVs (POPC:Col:bSM (1:1:1)) sin nAChR antes y después de dichos tratamientos mediante la extracción de lípidos y su posterior separación por TLC. Esta técnica nos permitió visualizar e identificar los lípidos presentes en las distintas muestras.

La imagen de las placas de TLC muestra que los tratamientos utilizados ocasionaron variaciones en la composición de los LUVs con respecto a la situación inicial (Figura 1 A). A partir de las placas se realizó un análisis semi-cuantitativo utilizando el programa Image J 1.43u (NIH, USA). Los resultados fueron expresados y graficados como la relación Col/SM (Figura 1 B). Se pudo confirmar que todos los tratamientos produjeron cambios estadísticamente significativos con respecto a la cantidad de Col en la situación control. Se comprobó un aumento cuando se incubaron los LUVs con Col. Luego de la incubación con CHEMS, la cantidad de Col se mantuvo igual que en la situación control y

se observó además la presencia de CHEMS, resultando en un incremento de casi un 70 % en la presencia de esteroides totales en la membrana. El tratamiento con la enzima Cox llevó a una disminución aproximada del 25 % en la cantidad de Col y a la aparición de colestenoína, lo que se condice con la conversión de parte del Col a colestenoína por la acción de dicha enzima.



**Figura 1.** Composición lipídica de los extractos de liposomas de POPC:Col:bSM (1:1:1) antes y después de los distintos tratamientos. A) TLC representativa de las distintas condiciones. B) Relación Col/bSM para cada una de las condiciones: situación control, agregado de más Col, agregado de CHEMS e incubación con Cox. Cada columna representa la media  $\pm$  D.S. de tres experimentos independientes. “\*” =  $p < 0,05$ .

## 2. MODIFICACIONES DEL ORDEN DE MEMBRANA

Para estudiar si el orden de membrana se vio modificado luego de los distintos tratamientos, realizamos experimentos de anisotropía de fluorescencia utilizando las sondas fluorescentes DPH y TMA-DPH, y experimentos de *GP* utilizando la sonda fluorescente Laurdan. El DPH es una molécula hidrofóbica que se localiza en la zona de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. De esta manera, esta sonda permite obtener

información sobre el orden y el empaquetamiento de las mismas en la parte más interna de la bicapa. El TMA-DPH posee un grupo nitrogenado unido a la estructura básica del DPH que provoca que esta sonda se localice en una zona más próxima a la interfase agua-lípido del liposoma o membrana y, por lo tanto, permite obtener información de una zona más superficial de la membrana. Al poseer una carga positiva, una vez agregada a los LUVs, la molécula del TMA-DPH permanece mayoritariamente en la hemicapa externa (Lentz *et al.*, 1993; Lee y Lentz, 1997). La sonda Laurdan posee un grupo polar dimetil amino que ancla a la molécula superficialmente en la membrana (Antollini *et al.*, 1996), pudiendo ubicarse tanto en la hemicapa interna como en la externa. Tiene la capacidad de sensar las moléculas de agua presentes en la membrana (Yu *et al.*, 1996), estando dicha presencia condicionada por el orden de la misma. De esta manera, la molécula Laurdan actúa como un indicador o reportero del orden de los lípidos presentes en la membrana (Parasassi *et al.*, 1991, 1994; Antollini *et al.*, 1996; Antollini y Barrantes, 1998). El aumento de los valores tanto de  $r$  como de  $GP$  se correlaciona con un aumento en el orden de membrana, mientras que una disminución de dichos valores con un menor orden de membrana (Barshtein *et al.*, 1997; Antollini y Barrantes, 1998; Harris *et al.*, 2002; Jaikishan *et al.*, 2010; Seel *et al.*, 2020). A fin de interpretarlos en conjunto y siempre que sea posible, hablaremos de valores de orden de membrana  $r/GP$ .

Para estos estudios trabajamos tanto con LUVs de lípidos sintéticos como con membranas ricas en nAChR, obteniendo resultados cualitativamente similares en ambos casos. Cuantitativamente, los valores de  $r/GP$  fueron mayores en membranas nativas que en sistemas modelo, posiblemente debido a su composición más compleja y a la presencia de proteínas (Tabla 1). En todos los casos se observó, además, que los valores de anisotropía correspondientes a TMA-DPH fueron mayores que los obtenidos con DPH debido a que, al localizarse el TMA-DPH más externamente en la membrana, esta sonda se encuentra de por sí en un entorno más ordenado.

Se observó que al incubarse las membranas con Col los valores de  $r/GP$  fueron similares a los obtenidos en la situación control (Tabla 1). Este resultado indica que a pesar de que hubo una incorporación efectiva de Col con un incremento aproximado del 50 %, tal como se puede apreciar en la figura 1, este incremento no llevó a un mayor orden de membrana, posiblemente debido a que habría una cantidad máxima de Col para afectar dicho orden y cantidades mayores no tendrían efecto, es decir, se llegaría a una saturación. Soto-Arriaza y colaboradores observaron que el Col lograba un máximo efecto en las propiedades de membranas de sistemas modelo binarios o ternarios cuando estaba en un 33 mol %, lo que coincide con la concentración de Col en nuestro sistema modelo control

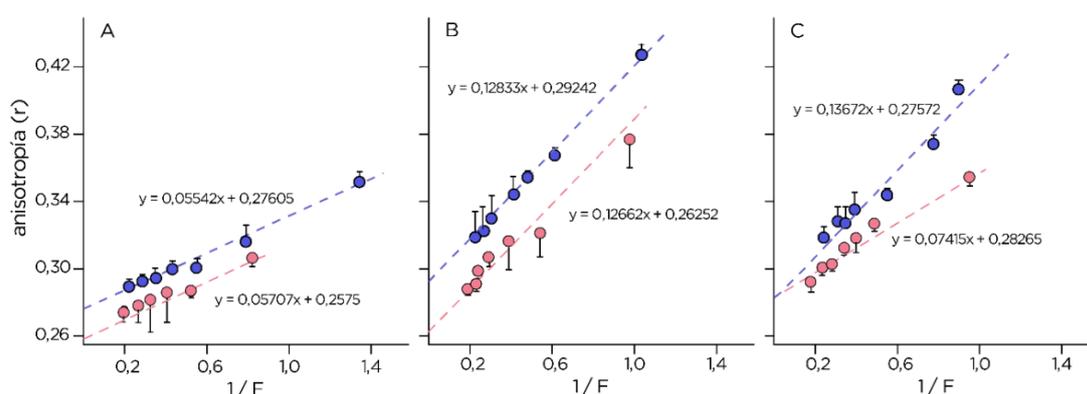
(Soto-Arriaza *et al.*, 2013). Resultados similares se observaron al transformar aproximadamente el 25 % del Col a colesteno por incubación con la enzima Cox; los valores de  $r/GP$  obtenidos fueron similares a los de la situación control (Tabla 1). Si bien el tratamiento con la enzima no cambió la cantidad absoluta de moléculas, parte de las moléculas de Col fueron oxidadas, modificación que evidentemente no afectó el orden de los lípidos de la membrana medido por estas técnicas.

	<i>Liposomas</i>		<i>Membranas</i>	
	<i>DPH</i>	<i>TMA-DPH</i>	<i>Laurdan</i>	<i>Laurdan</i>
<b>Control</b>	0,2851 ± 0,0004	0,3254 ± 0,0007	0,3455 ± 0,0106	0,4651 ± 0,0042
<b>+ Col</b>	0,2669 ± 0,0011	0,3269 ± 0,0012	0,3055 ± 0,0134 **	0,4565 ± 0,0091
<b>+ CHEMS</b>	0,3220 ± 0,0031 **	0,3811 ± 0,0012 **	0,4081 ± 0,0015 **	0,5052 ± 0,0042 **
<b>+ Cox</b>	0,2853 ± 0,0015	0,3288 ± 0,0021	0,3335 ± 0,0063	0,4645 ± 0,0007

**Tabla 1.** Valores de anisotropía de fluorescencia (DPH y TMA-DPH) y polarización generalizada (Laurdan) obtenidos a partir de LUVs y de membranas ricas en nAChR de *T. californica* antes y después de los distintos tratamientos. Los valores corresponden a la media ± D.S. de por lo menos tres experimentos independientes. “\*\*”=  $p < 0,001$ .

Una situación diferente se observó cuando tanto los liposomas como las membranas fueron incubados con CHEMS donde, a diferencia de lo que ocurrió con el agregado de más Col, el orden de membrana aumentó de manera significativa (Tabla 1). Es sabido que tanto el Col como el CHEMS causan efectos similares en las membranas (Kulig *et al.*, 2014, 2015), siendo la principal diferencia entre ambas moléculas la presencia de un grupo succinato cargado negativamente a pH 7,4 en el CHEMS que lo posiciona muy cerca de la interfase lípido-agua, impidiendo su pasaje transbicapa y concentrándolo en la hemicapa externa (Kulig *et al.*, 2014). Por lo tanto, el incremento del orden de membrana observado correspondería a perturbaciones mayoritariamente de la hemicapa externa. Con la intención de verificar esta conclusión realizamos experimentos adicionales en las condiciones control, con agregado de Col y con agregado de CHEMS. Medimos la

anisotropía de fluorescencia de las sondas DPH y TMA-DPH en presencia de TNBS (*trinitrobenzenesulfonic acid*), molécula polar extintora de fluorescencia que únicamente tiene acceso a los fluoróforos localizados en la hemicapa externa (Mondal *et al.*, 2009). La figura 2 muestra que en las tres condiciones estudiadas hubo un incremento de los valores de anisotropía tanto de DPH como de TMA-DPH en función de la concentración de TNBS. Considerando que la fluorescencia remanente corresponde principalmente a la hemicapa interna, este resultado sugiere que el mayor efecto de ordenamiento ocurre en esta hemicapa. Mediante ANCOVA se confirmó que las pendientes de las curvas obtenidas al linealizar los resultados fueron similares (curvas paralelas: no se rechazó la igualdad de pendientes pero si la igualdad de ordenadas) para DPH y TMA-DPH en la condición control (Figura 2 A) y en la de agregado de Col (Figura 2 B), aunque en esta última condición las pendientes fueron mayores. Esta similitud de pendiente con ambas sondas en cada condición habla de que las membranas poseen simetría transbicapa. Contrariamente, en la condición de agregado de CHEMS, ANCOVA confirmó que las pendientes obtenidas con DPH y con TMA-DPH fueron diferentes (se rechazó la igualdad de pendientes), siendo la primera similar a la condición control y la segunda a la condición de agregado de Col (por ANCOVA se confirmó igualdad de pendientes en ambos casos) (Figura 2 C). La diferencia observada confirma el hecho de que al adicionar CHEMS en la membrana se induce una asimetría transbicapa, permaneciendo la hemicapa interna similar a una situación control y confirmando que las moléculas de CHEMS se localizan mayoritariamente en la hemicapa externa.



**Figura 2.** Anisotropía de fluorescencia de las sondas fluorescentes DPH (círculos verdes) y TMA-DPH (círculos azules) en presencia de concentraciones crecientes de TNBS. A) Condición control, correspondiente a LUVs de POPC:Col:bSM (1:1:1), B) LUVs de POPC:Col:bSM (1:1:1) + Col, y C) LUVs de POPC:Col:bSM (1:1:1) + CHEMS. Las ecuaciones corresponden a la regresión lineal realizada para cada condición. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  S.D. de 3 experimentos independientes.

### 3. EFECTOS DEL COLESTEROL DE MEMBRANA SOBRE EL ESTADO CONFORMACIONAL DEL nAChR

Una vez controlado el sistema experimental, estudiamos cómo los cambios en la cantidad y localización de Col en la membrana repercutían en la funcionalidad del nAChR.

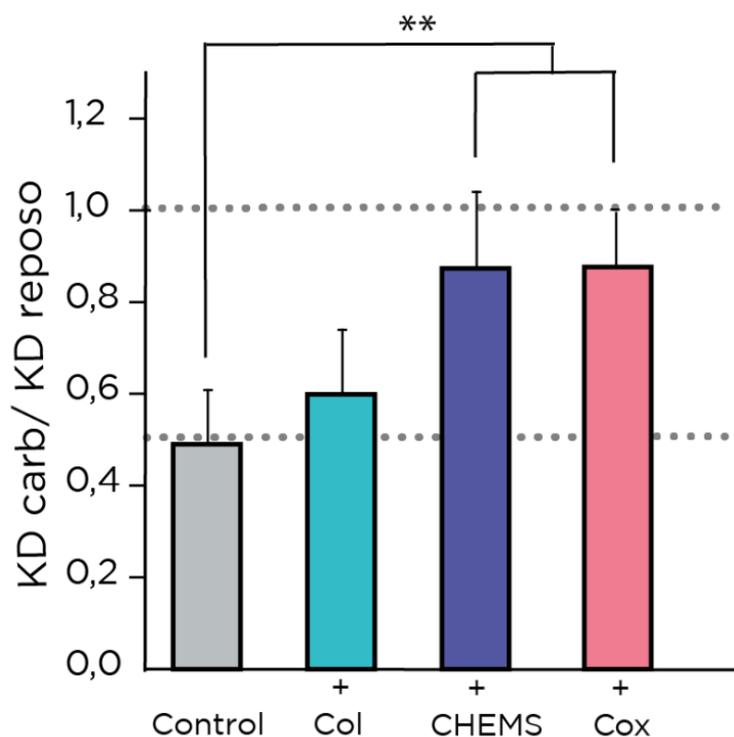
Para evaluar el estado conformacional del receptor utilizamos la sonda fluorescente CrV, que emite fluorescencia solo cuando se encuentra unida a la proteína. El CrV es un bloqueador de canal abierto que muestra una mayor afinidad por el nAChR muscular en estado D (en situación control, en presencia del agonista carb) respecto al receptor en estado de reposo (R, en situación control en ausencia del agonista carb) (Lurtz y Pedersen, 1999). Se utilizó el valor de  $KD$  de esta sonda fluorescente para inferir el estado conformacional del nAChR en las diferentes condiciones (Fernández Nieves *et al.*, 2008; Perillo *et al.*, 2012; Fabiani *et al.*, 2018).

Cuando las membranas ricas en nAChR se incubaron con Col no se observaron cambios con respecto a la situación control, los valores de  $KD$  obtenidos en ausencia y en presencia de carb fueron similares (Figura 3). Este resultado se condice con los resultados anteriores: la presencia de más Col tampoco modifica el orden de la membrana de nuestro sistema. Al incubar las membranas con CHEMS sí observamos una diferencia con respecto al control. Los valores de  $KD$  obtenidos para el receptor en ausencia de carb se mantuvieron similares a los de una situación control de reposo. Sin embargo, los valores de  $KD$  en presencia de carb aumentaron hasta valores similares a una situación de reposo (Figura 3). Por lo tanto, el incremento total de esteroides en la membrana, con la presencia asimétrica de CHEMS, alteró tanto el estado biofísico de la membrana como el estado conformacional del nAChR.

Al incubar las membranas con Cox, enzima que convierte parte del Col a colesteno, se observó que, al igual que en el caso anterior, los valores de  $KD$  en presencia de carb fueron similares a los de la situación control en estado de reposo (Figura 3). A diferencia de la situación anterior, en la condición de transformación de un 25 % del Col de membrana en colesteno no hubo perturbación del orden de la membrana (Tabla 1) y, por lo tanto, esto no podría explicar los cambios conformacionales en el nAChR evidenciados por el CrV.

Para las condiciones en las que se observó al nAChR estabilizado en valores de reposo, es decir, luego del tratamiento con CHEMS o con Cox, es importante tener en cuenta que este experimento solo permite sentir estados de equilibrio R o D. Es decir, no nos permite determinar si efectivamente el receptor se encuentra en un estado R, o si

existen otras situaciones que puedan estar ocurriendo, por ejemplo, cambios en el tiempo o velocidad de desensibilización del nAChR, o estabilización en otros sub-estados conformacionales. Estas posibilidades se estudiaron y describen más adelante.



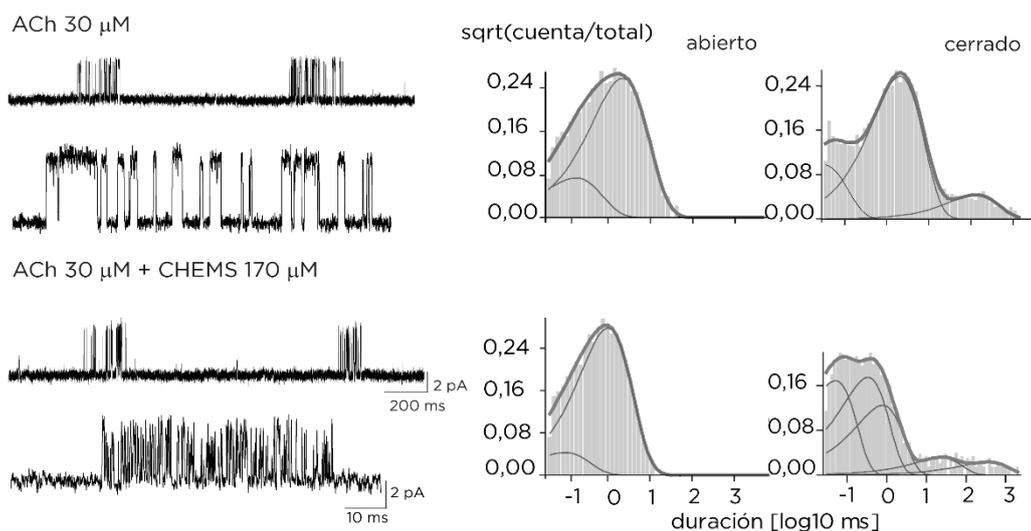
**Figura 3.** Cambios en la relación de los valores de *KD* del CrV (entre valores de *KD* en presencia de carb y valores de *KD* obtenidos en estado de reposo) de membranas ricas en nAChR de *T. californica*. La columna gris corresponde a la situación control. Los valores fueron calculados a partir de las curvas de titulación y corresponden a la media  $\pm$  D.S. de por lo menos 3 experimentos independientes. “\*\*”=  $p < 0,001$ .

A continuación, y a fin de entender el mecanismo molecular que subyace a los cambios observados en los equilibrios conformacionales del nAChR, evaluamos la funcionalidad del receptor en las condiciones experimentales de incubación con CHEMS y con Cox mediante la técnica de *patch-clamp*. Para ello se utilizó la configuración *cell-attached* para evaluar la activación del nAChR a nivel de canal único, con el agregado de los agonistas en la solución de pipeta; y la configuración *whole-cell* para medir corrientes macroscópicas activadas por un pulso de agonista.

#### 4. ACTIVACIÓN DEL nAChR EN CÉLULAS EXPUESTAS A CHEMS y Cox

Para los estudios en configuración *cell-attached*, se realizaron en una primera instancia controles con 30  $\mu\text{M}$  de ACh, agonista natural del nAChR. En esta condición se registraron eventos de  $5,2 \pm 0,6$  pA (a -70 mV de potencial de membrana) agrupados en *clusters* de  $120 \pm 65$  ms de duración con una probabilidad de apertura de  $0,4 \pm 0,1$  (Figura 4). El análisis de los registros permitió obtener los histogramas de tiempos de estados abiertos y cerrados característicos (Bouzat *et al.*, 2000; Corradi *et al.*, 2007), los cuales se describen con 2 componentes para el estado abierto, cuyas duraciones (y áreas relativas) fueron  $1,39 \pm 0,17$  ms ( $0,66 \pm 0,21$ ) y  $0,32 \pm 0,18$  ms ( $0,34 \pm 0,18$ ), y con 3 o 4 componentes para el estado cerrado, de los cuales los dos más breves corresponden a cierres dentro del *cluster* y cuyas duraciones medias (y áreas relativas) fueron  $0,135 \pm 0,090$  ms ( $0,17 \pm 0,07$ ) y  $1,518 \pm 0,304$  ms ( $0,74 \pm 0,12$ ) (n=9).

Para evaluar la actividad del nAChR en presencia de CHEMS, células BOSC 23 expresando el receptor muscular se incubaron con 170  $\mu\text{M}$  de CHEMS por 90 minutos. Finalizado el tiempo de incubación, se reemplazó el medio de cultivo DMEM por el *buffer* extracelular para realizar registros de *patch clamp* en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de ACh. Se observaron cambios cinéticos significativos y muy marcados con respecto a los registros obtenidos a partir de células sin tratar (Figura 4). Los eventos de canal único se agruparon en *clusters* de menor duración ( $52 \pm 19$  ms) con una probabilidad de apertura también reducida ( $0,35 \pm 0,06$ ) (n=11,  $p < 0,001$ ) respecto a la condición control (Figura 4). Se observó, además, una reducción del tiempo de estado abierto, los histogramas presentaron dos componentes cuyas duraciones fueron de  $0,75 \pm 0,15$  ms y  $0,11 \pm 0,06$  ms (n=11) (Figura 4). La duración del componente más prolongado fue significativamente menor que la del control ( $p < 0,001$ ). Los histogramas de estado cerrado mostraron 4 o 5 componentes, de los cuales los dos más breves, correspondientes a cierres dentro del *cluster*, fueron de  $0,036 \pm 0,012$  ms ( $0,31 \pm 0,08$ ) y  $0,97 \pm 0,39$  ms ( $0,61 \pm 0,17$ ). La comparación con la condición control mostró un aumento del área del componente más breve de estado cerrado en esta condición. Esto podría corresponderse con una estabilización de un estado cerrado breve o bien con un bloqueo del canal.



**Figura 4.** Registros de canal único del nAChR muscular luego de la activación por ACh 30  $\mu$ M antes y después de la incubación con CHEMS (170  $\mu$ M). Para cada condición se muestra un trazo a menor (arriba) y otro a mayor (abajo) resolución. Potencial de membrana: -70 mV. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

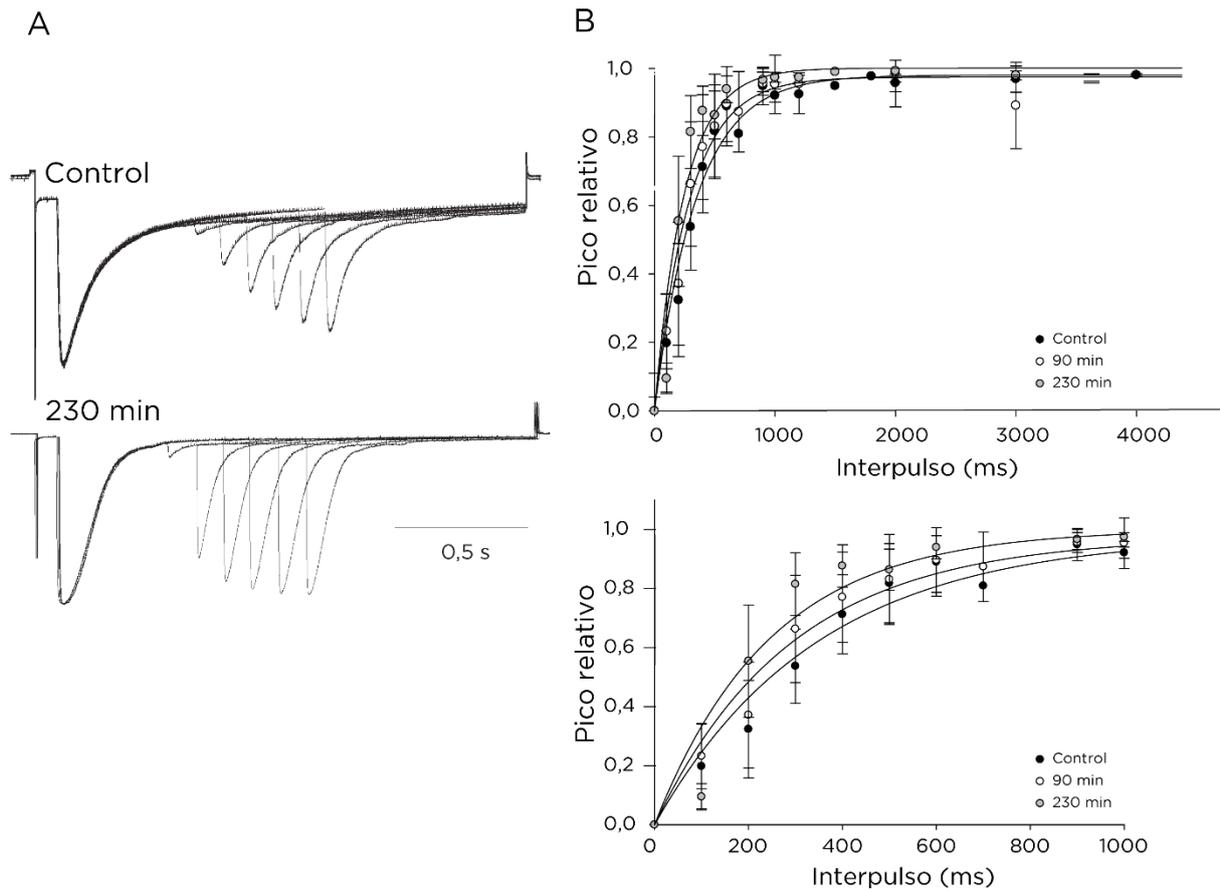
En conjunto, estos resultados muestran que la incubación con CHEMS produjo una modulación negativa del nAChR, observándose eventos de canal único de menor duración y agrupados en *clusters* también de corta duración, con una baja probabilidad de apertura. Esta modulación podría ser explicada por dos mecanismos diferentes: i) una disminución de la velocidad de apertura del canal y un aumento de la velocidad de cierre, o ii) un bloqueo del receptor.

Para evaluar la actividad del nAChR cuando parte del Col es transformado a colesteno, células BOSC 23 expresando el receptor muscular se incubaron por 90 o 230 min con una solución conteniendo 5U Cox/100  $\mu$ l DMEM. Obtuvimos luego, registros con 30  $\mu$ M de ACh y observamos que la activación del receptor fue similar a una situación control (explicada más arriba en el texto). En estas condiciones se observaron eventos de  $5,1 \pm 0,4$  pA (a -70 mV de potencial de membrana) agrupados en *clusters* de  $123 \pm 37$  ms, con una probabilidad de apertura de  $0,40 \pm 0,09$ . Los histogramas de estado abierto y cerrado mostraron el mismo número de componentes y valores similares a los del control ( $1,35 \pm 0,27$  ms y  $0,15 \pm 0,09$  ms para el estado abierto, y  $0,11 \pm 0,02$  y  $1,69 \pm 0,58$  ms para los componentes de cierres dentro del *cluster*). Estos componentes mostraron además una frecuencia similar a la del control, ya que las áreas de los mismos fueron de  $0,76 \pm 0,13$  y  $0,24 \pm 0,11$ , y  $0,19 \pm 0,09$  y  $0,71 \pm 0,09$ , para los componentes abierto y cerrado, respectivamente.

Es decir, los parámetros analizados a partir de registros de canal único no mostraron cambios funcionales que justifiquen los cambios conformacionales observados con la sonda fluorescente CrV.

Por ello, a fin de profundizar en el estudio de la funcionalidad del nAChR en presencia de Cox se realizaron registros de corrientes macroscópicas. Para esto, las células fueron incubadas con 5U Cox/ml durante 90 o 230 minutos y se registraron corrientes macroscópicas en la configuración de *whole-cell* activadas por un pulso de 300 ms con 300  $\mu$ M de ACh. En la situación control se observaron corrientes con un tiempo de crecimiento ( $tr_{10-90}$  %) de  $15 \pm 5$  ms las cuales decayeron completamente durante el tiempo de aplicación del agonista (ACh) por desensibilización (Figura 5 A). Estos resultados fueron similares a los reportados previamente (Arias *et al.*, 2006). Luego del tratamiento con Cox, el perfil de las corrientes activadas por el pulso de ACh fue similar al control (células no tratadas) en lo que respecta a sus velocidades de activación y desensibilización. Es decir, las corrientes macroscópicas no mostraron cambios significativos respecto a la condición control.

Para explorar otros posibles efectos del tratamiento, se midió el tiempo de recuperación de la desensibilización del nAChR. Para esto se realiza un pulso de ACh para generar una corriente control y permitir su total desensibilización (Figura 5 A), luego se aplica un pulso de duración variable de solución extracelular en ausencia de agonista (en este caso de 0 a 4000 ms) y finalmente un segundo pulso de ACh para activar nuevamente los receptores. Durante el pulso en ausencia de agonista el receptor se recupera de la desensibilización. El tiempo medio de recuperación de la desensibilización se obtiene comparando el pico de corriente del segundo pulso de ACh respecto del primero en función de la correspondiente duración del interpulso. Así, relacionamos la duración del pulso sin agonista con el porcentaje de corriente recuperada. Al graficar la fracción de corriente recuperada en función de la duración del pulso sin agonista se obtuvieron las curvas de recuperación de la desensibilización (Figura 5 B), las cuales se ajustaron a una función sigmoidea que permitió definir la fracción de corriente recuperada y el tiempo medio de recuperación para cada condición. Los resultados obtenidos en las diferentes condiciones indicaron que el tiempo de recuperación de las corrientes fue más breve en las células tratadas con Cox con respecto a la situación control:  $257 \pm 15$  ms para la situación control, y  $217 \pm 16$  ms y  $186 \pm 7$  ms para las células incubadas con Cox durante 90 o 230 min, respectivamente (Figura 5 B).



**Figura 5.** Recuperación del pico máximo de corriente en función del tiempo transcurrido hasta el siguiente pulso de ACh. A) Corrientes obtenidas en situación control y luego de la incubación de las células con Cox durante 230 min. B) Curvas obtenidas en situación control y luego de la incubación de las células con Cox durante 90 o 230 minutos en 2 escalas temporales, a 4000 ms y a 1000 ms.

Es decir, luego de la incubación de las células con Cox el receptor fue capaz de abrirse y desensibilizarse en presencia del agonista ACh, en forma similar a la condición control, lo que se condice con lo observado en los registros de canal único. Sin embargo, el nAChR se recuperó de la desensibilización más rápidamente que en una situación control. Estos resultados apoyan los resultados de fluorescencia obtenidos utilizando la sonda CrV, en donde el nAChR se mantuvo en estado de reposo aún en presencia del agonista carb. A diferencia de los registros electrofisiológicos que permiten resolver en tiempo real los cambios conformacionales, los estudios con CrV solo detectan los estados más estables, en reposo y desensibilizado. Es posible que la mayor recuperación de la desensibilización en células tratadas con Cox haga, por lo tanto, que en este tipo de experimento el receptor se observe como en un estado de reposo.

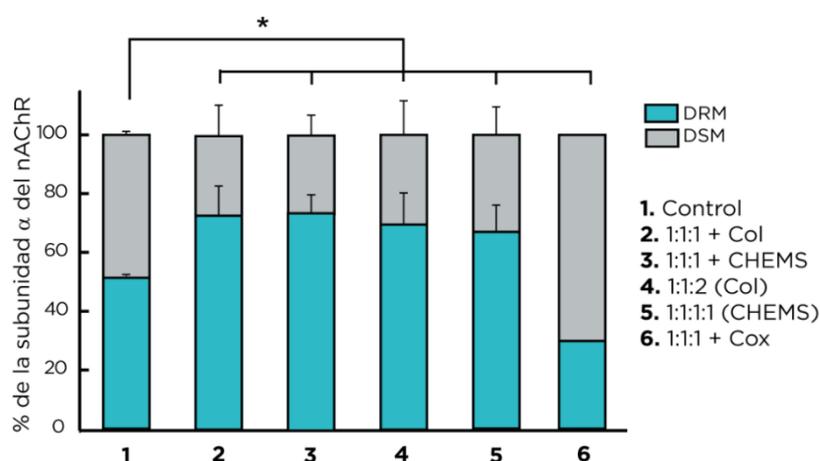
## 5. RELACIÓN ENTRE EL COLESTEROL DE MEMBRANA Y LA DISTRIBUCIÓN DEL nAChR EN DOMINIOS Lo Y/O Ld

Una estrategia utilizada para estudiar los dominios *raft* es su relativa resistencia a la solubilización por Tritón X-100 a 4 °C, que permite obtener fracciones DRM y DSM, correspondientes a dominios Lo y Ld, respectivamente.

A partir de los cambios observados en la funcionalidad y conformación del nAChR debidos a alteraciones del Col de la membrana, nos preguntamos qué es lo que ocurría con respecto a la preferencia del nAChR por dominios Lo o Ld en las distintas condiciones experimentales. Para estudiar su localización se utilizaron liposomas de POPC:Col:bSM (1:1:1) conteniendo al nAChR previamente purificado a partir de membranas de *T. californica*. Los liposomas tratados con Col, CHEMS y Cox fueron incubados con Tritón X-100 1 % durante 30 min a 4 °C, y una ultracentrifugación posterior permitió obtener las fracciones DRM y DSM. Estas fracciones se trataron con TCA 10 % a fin de precipitar las proteínas presentes en las mismas (nAChR), las cuales se corrieron luego en un gel de poliacrilamida.

En una situación control se observó que prácticamente el 50 % de la subunidad  $\alpha$  del nAChR se localizó en la fracción DRM (Figura 6), lo cual se corresponde con lo reportado previamente (Bermúdez *et al.*, 2010; Perillo *et al.*, 2016). Observamos que en las condiciones de agregado de Col o de CHEMS (de manera de estar frente a una condición simétrica o asimétrica de incremento de este esteroles, respectivamente) hubo un aumento similar y estadísticamente significativo del nAChR en la fracción DRM (Figura 6). Para interpretar mejor este resultado realizamos dos condiciones adicionales: preparamos proteoliposomas con una cantidad mayor de Col o con Col + CHEMS (POPC:Col:bSM (1:1:2) y POPC:Col:bSM:CHEMS (1:1:1:1), respectivamente). En ambas condiciones el nAChR se localizó mayoritariamente en la fracción DRM (Figura 6), de manera similar a lo observado con los tratamientos; es decir, la distribución asimétrica del CHEMS no influyó la afinidad del nAChR por los dominios Lo. Por lo tanto, a pesar de que el diferente orden de membrana observado al agregar Col o CHEMS sugeriría que habría una diferente organización de dominios Lo, ya sea en cantidad y/o en composición lipídica, estos resultados no permiten discriminar entre ambas posibilidades. El aumento de la cantidad de nAChR en dominios Lo puede hablar tanto de una mayor cantidad de dominios Lo con igual afinidad del nAChR por ellos, o de un cambio en la composición lipídica de los dominios que se correlacione con una mayor afinidad del nAChR, llevando a una mayor concentración de receptores en dichos dominios.

Luego del tratamiento con Cox, por el contrario, el nAChR se ubicó preferentemente en la fracción DSM (Figura 6). Es sabido que la oxidación del Col de la membrana produce una disrupción de los dominios Lo (Neuvonen *et al.*, 2014) dado que la colesteno no tiene preferencia por dichos dominios. Por lo tanto, se puede considerar que el aumento de los receptores en fase Ld se debe a una disminución significativa de los dominios Lo, y que el nAChR posee la misma afinidad que en situación control por dichos dominios. Además, dado que el orden de membrana permanece constante en estas condiciones se puede suponer que, sumado a la menor cantidad de dominios Lo, la mayor cantidad de dominios Ld ahora poseen un orden de membrana diferente al de la situación control, posiblemente mayor, y que quizá favorezca la presencia de receptores en ellos. De esta manera, el diferente entorno lipídico del nAChR podría explicar los cambios en su funcionalidad y equilibrio conformacional.

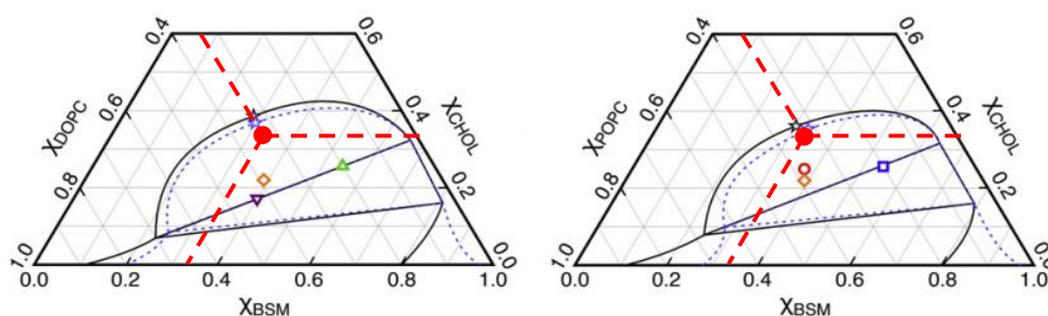


**Figura 6.** Porcentaje de la subunidad  $\alpha$  del nAChR en las fracciones DRM y DSM obtenidas de liposomas de POPC:Col:bSM (1:1:1) conteniendo el nAChR purificado y calculado a partir del SDS-PAGE. Los valores corresponden a la media  $\pm$  D.S. de por lo menos 3 experimentos independientes. “\*” =  $p < 0,05$ .

## 6. MODIFICACIONES DEL COLESTEROL DE MEMBRANA Y FORMACIÓN DE DOMINIOS Lo

A continuación, y a fin de entender los cambios observados en la distribución del nAChR entre dominios Lo y Ld luego de los diferentes tratamientos, realizamos experimentos con GUVs, sistemas modelo que pueden ser observados al microscopio. Para visualizarlos y estudiarlos se utilizó la sonda DiI-C18, un colorante fluorescente que es excluido de los dominios ordenados y, por lo tanto, permite la diferenciación entre estos y los dominios desordenados.

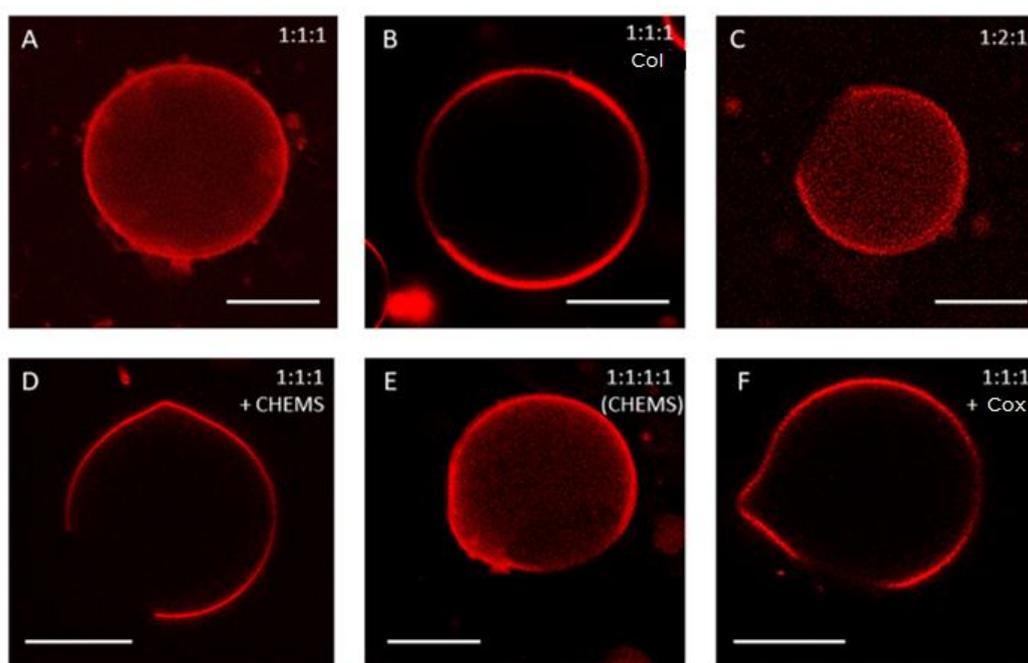
Como situación control, los GUVs se formaron a partir de una mezcla de lípidos POPC:Col:bSM (1:1:1). En estas condiciones, a 23 °C hay coexistencia de dominios Ld y Lo, sin embargo, los dominios son transitorios y nanoscópicos y, por lo tanto no son observables al microscopio (Petruzielo *et al.*, 2013). Para tener una condición en la cual los dominios pudieran verse por microscopía, se obtuvieron GUVs con una mezcla de DOPC:Col:eSM (1:1:1) que presenta coexistencia de dominios Ld y Lo microscópicos. Mientras que POPC es un lípido abundante en las membranas biológicas, DOPC no es frecuentemente encontrado en membranas celulares; sin embargo, dado que en sistemas ternarios forma dominios microscópicos, es ampliamente usado en sistemas modelo para el estudio de los mismos (Zhao *et al.*, 2007). La Figura 7 muestra que las dos mezclas ternarias utilizadas se encuentran en la zona de coexistencia de dominios Lo y Ld (círculos rojos en los dos triángulos de Gibbs)



**Figura 7.** Diagramas de fase para POPC:Col:bSM (1:1:1) y DOPC:Col:eSM (1:1:1) a 15°C (línea azul sólida) o a 25°C (línea azul punteada) (extraídos de Petruzielo *et al.*, 2013). Los distintos puntos señalados indican diferentes composiciones. Las líneas rojas muestran la fracción de cada lípido en los sistemas estudiados y los círculos rojos la composición ternaria resultante. El área dentro del semicírculo formado por las líneas azules indica la coexistencia de dominios Lo/Ld.

Los GUVs obtenidos por electroformación, tal como se indica en la sección de metodología, se sometieron a los distintos tratamientos y se observaron luego al microscopio. Inicialmente se estudió el efecto de los tratamientos en GUVs formados con POPC. Esta condición, además de corresponderse con los sistemas modelo utilizados en los estudios anteriores, permite evaluar si una alteración de la composición es capaz de alterar el tamaño de los dominios Lo de manera tal que estos sean observables por microscopía. Esta estrategia fue utilizada previamente en el laboratorio, observándose una relación entre el tamaño de los dominios Lo y la especie de SM presente en la membrana modelo (Perillo *et al.*, 2015).

Con la intención de ver si el aumento de nAChR en dominios Lo observado luego del agregado de Col o CHEMS correspondía a un aumento de los dominios Lo, se incubaron GUVs de POPC:Col:bSM (1:1:1) con Col o con CHEMS. En ambas condiciones experimentales se observó la aparición de dominios Lo microscópicos (Figura 8). De esta manera, tanto la incorporación simétrica del Col (debido a su capacidad de *flip-flop*) (Figura 8 B) como la incorporación asimétrica del CHEMS (Figura 8 D) resultaron en una coexistencia de dominios Lo-Ld observables al microscopio. Para confirmar que este efecto se debió a la presencia de más Col o CHEMS, independientemente de la distribución simétrica o asimétrica, obtuvimos GUVs con dos composiciones adicionales: POPC:Col:bSM (1:2:1) y POPC:Col:bSM:CHEMS (1:1:1:1). Al igual que en las condiciones anteriores, se observó una coexistencia de dominios Lo-Ld (Figura 8 C y E).



**Figura 8.** Microscopía de fluorescencia confocal de GUVs marcados con DiI-C18. La imagen A corresponde a la situación control POPC:Col:bSM (1:1:1), las imágenes B-F corresponden a las distintas condiciones experimentales. Las barras de escala representan 50  $\mu\text{m}$ .

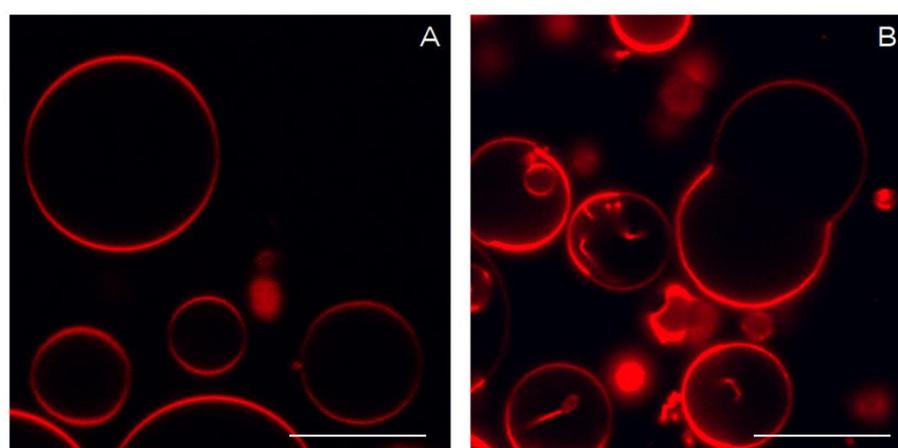
Por lo tanto, los dominios Lo observados luego de los distintos tratamientos podrían explicarse teniendo en cuenta el incremento de las moléculas de esteroides totales independientemente de su distribución transbica, lo cual podría producir ya sea la coalescencia de dominios nanoscópicos o un aumento de su tamaño.

Los GUVs compuestos por POPC:Col:bSM (1:1:1) fueron incubados también con la enzima Cox. Luego del tratamiento enzimático, se observó la aparición de dominios Lo

microscópicos (Figura 8 F). La oxidación de cerca del 25 % del Col a colestenoa podría llevar a una estructura de membrana diferente que implique una migración de las moléculas de colestenoa desde los dominios Lo (Xu and London, 2000; Samsonov *et al.*, 2001; Rouquette-Jazdanian *et al.*, 2006; Neuvonen *et al.*, 2014), lo que generaría un intercambio con las moléculas de Col localizadas inicialmente en dominios Ld. De esta forma, ambos tipos de dominios cambiarían tanto su composición como, probablemente, sus propiedades biofísicas, lo que podría llevar a la coalescencia de los dominios Lo nanoscópicos que se mantuvieron luego del tratamiento con Cox.

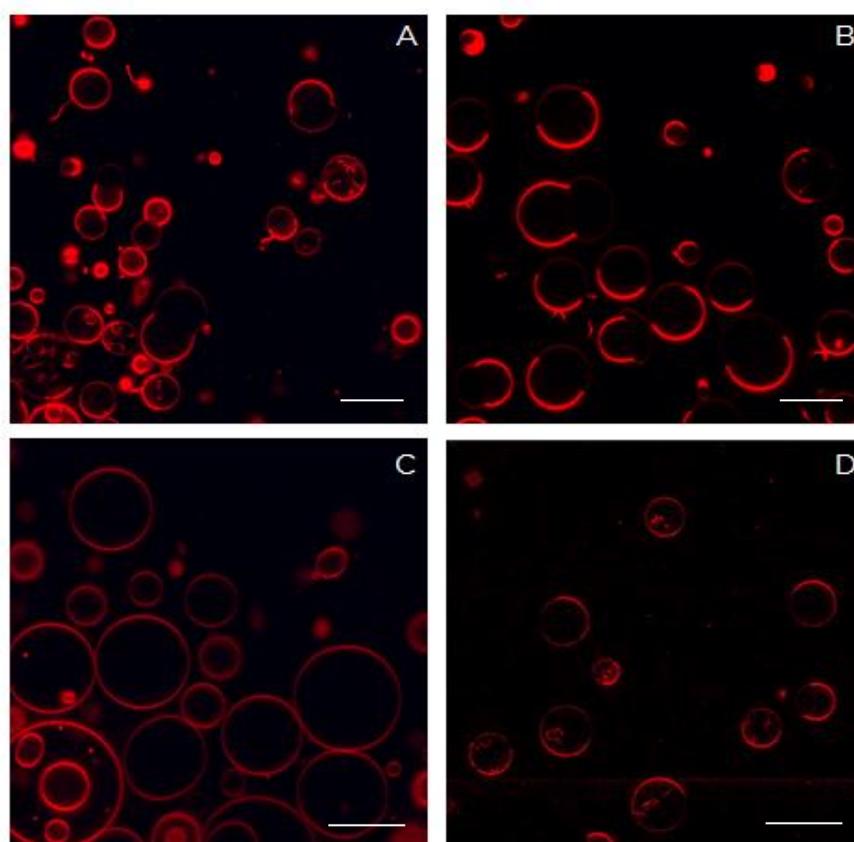
Con la intención de complejizar el modelo para estudiar el efecto de las alteraciones en el Col de membrana sobre el nAChR y considerando que hasta ahora no ha sido posible obtener GUVs con nAChR, nos propusimos estudiar el comportamiento del péptido correspondiente a la porción TM4 de la subunidad  $\gamma$  del nAChR, segmento de mayor contacto con los lípidos, mediante su incorporación en vesículas de POPC:Col:eSM (1:1:1) o de DOPC:Col:eSM (1:1:1).

Como condición control se formaron los GUVs con una mezcla de lípidos de POPC:Col:eSM o DOPC:Col:eSM, en ausencia del péptido de interés. Cuando las vesículas se formaron con POPC, como era esperable, no se observó una separación de fases (Petruzielo *et al.*, 2013) (Figura 9 A), mientras que cuando se formaron con DOPC sí se pudieron distinguir claramente los dominios Lo de los dominios Ld (Figura 9 B).



**Figura 9.** Microscopía de fluorescencia confocal de GUVs marcados con DiI-C18. A) POPC:Col:eSM (1:1:1), sin separación de fases. B) DOPC:Col:eSM (1:1:1), con separación de fases. Las barras de escala representan 50  $\mu\text{m}$ .

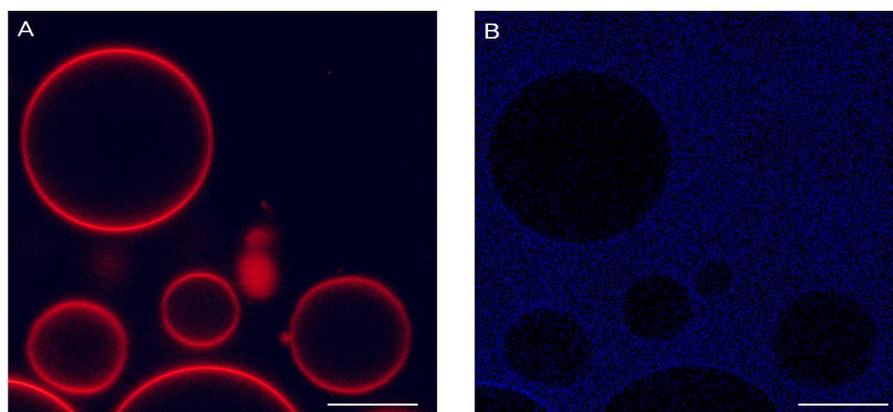
Las vesículas de DOPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4, en una relación lípido:péptido 125:1 y 250:1, fueron semejantes a las obtenidas en una situación control en ausencia de  $\gamma$ TM4, observándose vesículas de tamaños y formas similares, y con separación de fases (Figura 10 A y B). Con respecto a las vesículas de POPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4, cuando la relación lípido:péptido fue de 250:1, estas fueron similares a las obtenidas en ausencia del péptido, es decir, no se observó la formación de dominios (Figura 10 C). Sin embargo, cuando la relación lípido:péptido fue de 125:1 se detectaron dominios, indicando esto que el péptido ocasionó un aumento del tamaño de los dominios existentes (de dominios nanoscópicos a dominios microscópicos) o la coalescencia de los mismos (Figura 10 D).



**Figura 10.** Microscopía de fluorescencia confocal de GUVs marcados con DiI-C18. A) DOPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 (L:P 250:1), B) DOPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 (L:P 125:1), C) POPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 (L:P 250:1), D) POPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 (L:P 125:1). Las barras de escala representan 50  $\mu$ m.

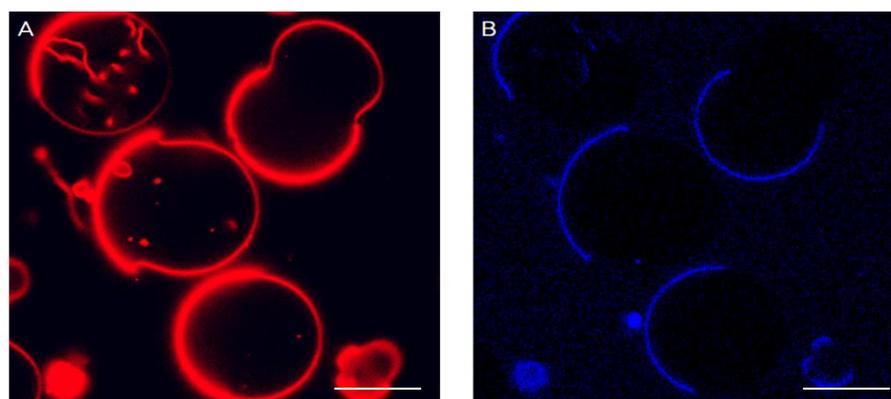
Para intentar dilucidar si el péptido se localiza preferentemente en dominios Lo o Ld, o bien si lo hace indistintamente en ambos dominios, las vesículas conteniendo el péptido fueron marcadas con cumarina. Esta sonda emite fluorescencia cuando reacciona con grupos tioles, en este caso los presentes en el  $\gamma$ TM4. Trabajamos con vesículas de DOPC:Col:eSM (1:1:1) o de POPC:Col:eSM (1:1:1) conteniendo o no el péptido

correspondiente a la región  $\gamma$ TM4 del nAChR, en una relación lípido:péptido 250:1. En vesículas de POPC:Col:eSM (1:1:1), que no presentan separación de fases, no fue posible detectar señal de la cumarina en las membranas (Figura 11).



**Figura 11.** Microscopía de fluorescencia confocal de GUVs de POPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4. A) Marcados con DiI C-18. B) Marcados con DiI C-18 y cumarina. Las barras de escala representan 25  $\mu$ m.

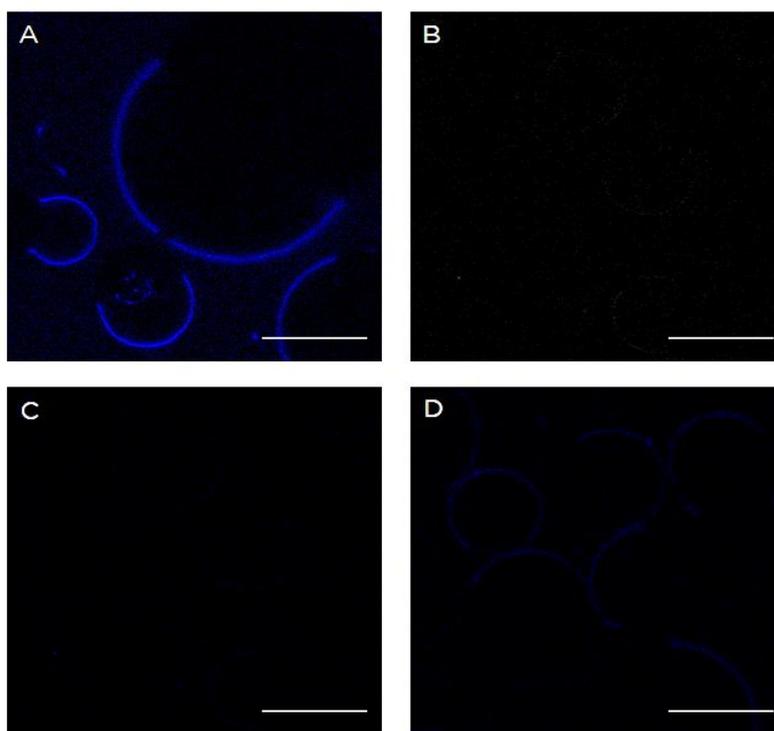
En las vesículas de DOPC:Col:eSM (1:1:1), en cambio, se detectó señal de fluorescencia de cumarina. Esta señal coincide con la señal de fluorescencia de la sonda diI, indicando que el péptido particiona preferentemente en dominios Ld (Figura 12).



**Figura 12.** Microscopía de fluorescencia confocal de GUVs de DOPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4. A) Marcados con DiI C-18. B) Marcados con DiI C-18 y cumarina. Se observa la señal de la cumarina en los dominios Ld (se corresponde con una intensidad de fluorescencia mayor de la sonda DiI-C18). Las barras de escala representan 25  $\mu$ m.

Para descartar una señal inespecífica de la cumarina, se realizaron diferentes controles: DOPC:Col:eSM (1:1:1) y DOPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 (L:P 250:1) con DiI-C18

y sin cumarina, y DOPC:Col:eSM (1:1:1) sin  $\gamma$ TM4 con DiI-C18 y cumarina (Figura 13). Si bien en la condición con solo DiI-C18 (Figura 13 B y C), al utilizar la longitud de onda de excitación de la cumarina (405 nm) se detectó señal de emisión a la intensidad correspondiente a la cumarina, la misma fue despreciable en comparación con la señal obtenida cuando las vesículas de DOPC:Col:eSM +  $\gamma$ TM4 fueron marcadas con cumarina (Figura 13 A). De manera similar, en presencia de cumarina, pero en ausencia de  $\gamma$ TM4, la señal fue mucho más débil (Figura 13 D).

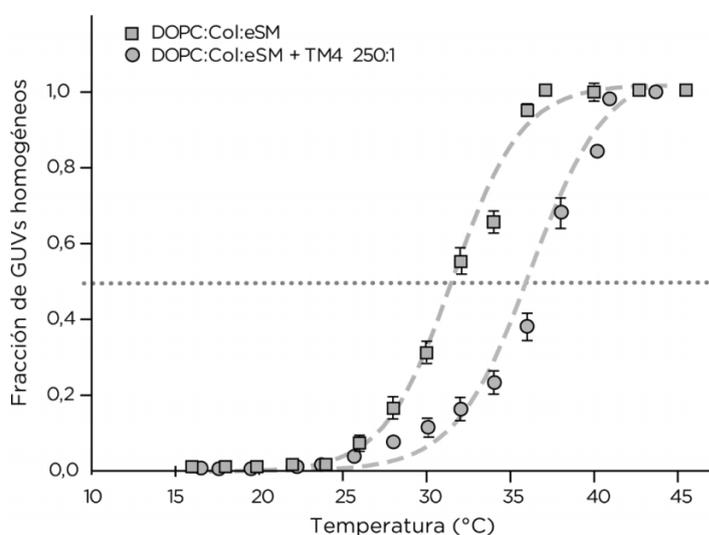


**Figura 13.** Microscopía de fluorescencia confocal de GUVs. A) DOPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 marcados con DiI C-18 y cumarina. B) DOPC:Col:eSM (1:1:1) marcados con DiI C-18. C) DOPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 marcados con DiI C-18. D) DOPC:Col:eSM (1:1:1) marcados con DiI C-18 y cumarina. Las barras de escala corresponden a 25  $\mu$ m.

Dado que no se detectaron diferencias en cuanto al tamaño, forma y presencia de dominios entre los GUVs de DOPC:Col:eSM (1:1:1) con y sin péptido, nos propusimos realizar estudios adicionales para ver si existían diferencias de otro tipo a nivel de membrana. Para esto, estudiamos la temperatura de transición de GUVs de DOPC:Col:eSM (1:1:1) conteniendo o no el péptido  $\gamma$ TM4 (L:P 250:1). Esta determinación consiste en el recuento de vesículas con separación de fases en función de la temperatura. Para esto, se realizó un aumento gradual de la temperatura (cada 2  $^{\circ}$ C) de una cámara especial en donde se encuentran contenidas las vesículas, desde una temperatura en la

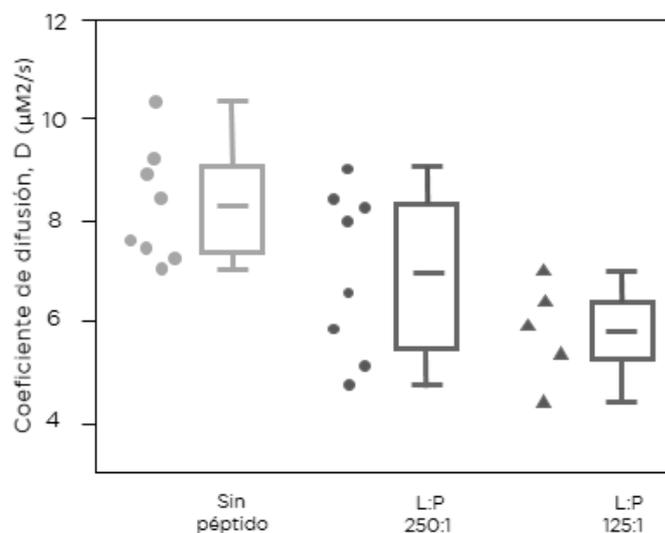
que todas las vesículas presenten separación de fases, hasta una temperatura a la cual todas las vesículas sean homogéneas (en cada condición se contaron un total de 100 vesículas). Los resultados obtenidos fueron graficados y ajustados con una función sigmoidea para así calcular la temperatura de miscibilidad, temperatura a la cual la mitad de las vesículas se encuentran como vesículas homogéneas.

La figura 14 muestra que la temperatura de miscibilidad aumenta de 31,6 °C en los GUVs sin péptido a 36,3 °C en las vesículas conteniendo  $\gamma$ TM4 (L:P 250:1). Este incremento confirma el hecho de que el péptido se particiona en la membrana de los GUVs, y sugiere un orden mayor de los lípidos en los dominios Ld, lo que podría ser consecuencia de su localización en estos dominios.



**Figura 14.** Fracción de GUVs de DOPC:Col:eSM (1:1:1), con y sin  $\gamma$ TM4, sin coexistencia microscópica de dominios (GUVs homogéneos) en función de la temperatura. Se muestran las curvas obtenidas luego del ajuste a una función de Boltzmann de los puntos experimentales calculados para las distintas temperaturas en cada condición. A partir de las curvas se calculó la temperatura de miscibilidad/transición para cada una de las condiciones. Los valores iniciales y finales fueron fijados en 0 y 1, respectivamente. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  D.S. de 3 experimentos independientes.

Para confirmar esta hipótesis se realizaron mediciones de FRAP con GUVs de DOPC:Col:eSM (1:1:1) conteniendo o no  $\gamma$ TM4 en dos relaciones molares (L:P 250:1 y 125:1). Se observó que la velocidad de difusión de la sonda DiI-C18 disminuyó significativamente en presencia del péptido y de manera dependiente de la concentración del mismo (Figura 15).



**Figura 15.** Coeficiente de difusión de la sonda DiI-C18 en GUVs de DOPC:Col:bSM (1:1:1) sin  $\gamma$ TM4 (situación control) o con  $\gamma$ TM4 en dos relaciones L:P diferentes, 250:1 y 125:1. Los valores corresponden a la media  $\pm$  D.S. de 3 experimentos independientes.

De esta manera, se pudo verificar que la sola presencia de un componente proteico en el sistema altera las características de la membrana, llevando al sistema a un mayor orden. Esto, además, apoya la diferencia de los valores de orden de membrana observados en membranas nativas con respecto a aquellos observados en sistemas modelos conformados únicamente por lípidos.

## DISCUSIÓN

Dado el carácter transmembrana de los nAChRs, es bien conocido que las propiedades o características de los lípidos de la membrana en la que se encuentran embebidos son fundamentales, ya que dichos lípidos influyen en la actividad de estos receptores afectando tanto su función como su localización y organización en la misma. (Barrantes, 2004; daCosta *et al.*, 2004; Pediconi, *et al.*, 2004; Baier y Barrantes, 2007; Baenziger *et al.*, 2015). Por otro lado, ha sido demostrado que los lípidos que componen las membranas celulares cambian en respuesta al envejecimiento y a distintas enfermedades neurodegenerativas como la EA (Yadav y Tiwari, 2014), y, además, varían en los distintos tejidos. Resulta de gran importancia entonces entender cómo los cambios en el entorno lípido del nAChR generan un impacto en el mismo.

El capítulo I de este trabajo de Tesis se enfocó en estudiar cómo diferentes modificaciones del Col de membrana afectan la localización y función del nAChR muscular. Para esto se trabajó con distintos sistemas de estudio (GUVs, LUVs, membranas ricas en nAChR o cultivos celulares) a los que se les realizó diferentes tratamientos para alterar su composición lipídica, centrados en el contenido de Col. Se obtuvieron tres condiciones diferentes:

- Enriquecimiento en Col. En esta condición se aumentó la cantidad total de Col en la membrana, y, dados los sistemas de estudios utilizados y la capacidad de *flip-flop* que posee esta molécula, su distribución en la membrana se consideró simétrica.
- Enriquecimiento en CHEMS. Se aumentó la cantidad de esteroides totales en la membrana por incubación de los distintos sistemas de estudio en una solución conteniendo CHEMS, molécula similar al Col pero con un grupo succinato cargado negativamente que lo posiciona cerca de la interfase lípido-agua y lo concentra en la hemicapa externa (Massey, 1998; Kulig *et al.*, 2014). De esta forma, el tratamiento con CHEMS permitió obtener una condición de asimetría de membrana.
- Oxidación de parte del Col total a colestenoína por tratamiento con la enzima Cox. Dicha enzima se asocia a la membrana lipídica y cataliza así la conversión del Col a 4-colestenoína-3-ona (colestenoína). En la colestenoína, el grupo 3-hidroxilo del Col es reemplazado por una cetona, que posee una menor capacidad de formar puentes de hidrógeno. Debido a esto, la colestenoína se localiza principalmente en dominios Ld en membranas

modelo y es por esta razón que el tratamiento con Cox fue utilizado para desorganizar los dominios ricos en Col de la hemicapa externa. Además, esta molécula presenta una alta capacidad de *flip-flop* (Neuvonen et al., 2014).

En una primera instancia, se buscó garantizar que los tratamientos utilizados estuvieran produciendo los cambios deseados de manera tal de obtener las tres condiciones experimentales. Se trabajó para esto con LUVs de POPC:Col:bSM (1:1:1) a los que se expuso a los distintos tratamientos, realizando luego la extracción lipídica de cada una de las muestras y su posterior separación por TLC. Mediante esta técnica se pudo confirmar que todos los tratamientos produjeron cambios estadísticamente significativos con respecto a la situación control: un aumento de ~ 50 % del Col de membrana cuando los LUVs se incubaron en presencia de Col; un incremento de ~ 70 % en los esteroides totales cuando los LUVs se incubaron en presencia de CHEMS; y una disminución aproximada del 25 % en la cantidad de Col, que se corresponde con su conversión a colesteno, cuando los LUVs fueron incubados en presencia de Cox.

Obtenidos estos resultados favorables, se continuó con el resto de los estudios. Para estudiar el orden de membrana en LUVs de POPC:Col:bSM (1:1:1) o en membranas ricas en nAChR de *T. californica*, utilizamos las sondas fluorescentes Laurdan (Parasassi et al., 1991, 1994; Antollini et al., 1996; Antollini y Barrantes, 1998), DPH y TMA-DPH (Lentz et al., 1996; Lee y Lentz, 1997), obteniendo a partir de ellas valores de *GP* y *r*, respectivamente, como indicadores del orden de los lípidos presentes.

Si bien la incubación de los sistemas modelo con Col produjo un incremento del 50 % en el Col total de membrana, no se observaron cambios significativos en los valores de *r* y *GP* con respecto a la situación control. Esto indicaría que el orden de membrana no se ve afectado en estas condiciones. Distintos trabajos postulan que habría una cantidad máxima de Col para afectar el orden del sistema, hasta que se llega a una saturación y no se producen más cambios (Chong et al., 2009; Soto-Arriaza et al., 2013). Soto-Arriaza y colaboradores observaron en sistemas binarios y ternarios que la incorporación del Col a los mismos lograba un máximo efecto sobre el orden de membrana cuando se encontraba en un 33 mol % (Soto-Arriaza et al., 2013). Este porcentaje coincide con la concentración de Col en los sistemas modelo control de este trabajo de Tesis, y podría explicar el hecho de que a pesar de incrementarse la cantidad de Col en un 50 % no se observen cambios en el orden de membrana. Esto se condice con los resultados de fluorescencia obtenidos utilizando la sonda CrV: cuando las membranas ricas en nAChR de *T. californica* fueron enriquecidas en Col, no se observaron cambios en el estado conformacional del nAChR con

respecto a la situación control. En este sentido, ha sido demostrado que el número de nAChRs funcionales que se abren en respuesta al agonista aumenta con el porcentaje de Col en la bicapa, alcanzando un máximo a ~ 30-35 mol % de Col (Rankin *et al.*, 1997; Hamouda *et al.*, 2006). Las membranas ricas en nAChR de *T. californica* poseen ~ 35 mol % de Col (Hamouda *et al.*, 2006). Por lo tanto, la situación control posee la concentración de Col óptima no solo para causar el máximo efecto de orden de membrana sino también para brindar el mejor entorno a fin de lograr la máxima estabilidad del equilibrio conformacional del nAChR, y, por lo tanto, la adición de más Col no conlleva a cambios en el mismo.

El CHEMS es un derivado del Col que presenta un grupo succinato cargado negativamente a pH 7,4 que lo posiciona cerca de la interfase lípido-agua, concentrándolo en la hemicapa externa (Massey *et al.*, 1998; Kulig *et al.*, 2014). Es sabido que tanto el Col como el CHEMS causan efectos similares en las membranas, reduciendo la movilidad de las cadenas acílicas y estabilizando de esta manera las mismas (Massey, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2005). Dependiendo el sistema lipídico en estudio, algunos autores postulan que el CHEMS posee una mayor capacidad para estabilizar las membranas (Ding *et al.*, 2005), aunque la mayoría coinciden en que el mayor efecto ordenador lo posee el Col (Massey *et al.*, 1998; Kulig *et al.*, 2014, 2015). Los resultados de este capítulo mostraron que, luego de la incubación con CHEMS, el orden de membrana aumentó significativamente tanto en membranas ricas en nAChR como en LUVs. Utilizando liposomas de POPC y la sonda DPH, Massey y colaboradores (1998) observaron mayores cambios en la anisotropía de fluorescencia cuando se incubaron con Col que los observados cuando se incubaron con CHEMS (Massey, 1998). Nuevamente, esta aparente contradicción con los resultados aquí presentados puede ser explicada teniendo en cuenta la condición de saturación en Col de los sistemas control utilizados.

Las diferencias que existen entre Col y CHEMS en cuanto a los efectos en el orden de membrana en sistemas modelo podrían resultar en diferencias con respecto a la interacción lípido-proteína en las membranas biológicas (Kulig *et al.*, 2015). La distribución asimétrica de CHEMS produjo alteraciones tanto en el estado biofísico de la membrana como en el estado conformacional del nAChR. Aún en presencia de carb, el nAChR permaneció en estado de reposo, situación diferente a lo que se observó luego de la incubación con Col.

Otra de las condiciones estudiadas fue la transformación de parte del Col de membrana a colesteno, mediante la acción de la Cox (Sampson *et al.*, 2001; Sampson y Vrielink, 2003; Lario *et al.*, 2003). Se ha postulado que esta enzima se une directamente

en la superficie de la membrana sin inducir mayores modificaciones en su estructura (Chen *et al.*, 2000) y, una vez que se encuentra unida, ocurre un cambio conformacional que lleva a la formación de un canal hidrofóbico permitiendo el acceso del Col al sitio activo de la enzima (Sampson y Vrieling, 2003; Ahn y Sampson, 2004). La actividad de la Cox es sensible a las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de las membranas, como la composición lipídica, la concentración de Col, el empaquetamiento lipídico, entre otras (De Martinez y Green, 1979; Pal *et al.*, 1980; Ghoshroy *et al.*, 1997; Ahn y Sampson, 2004).

El orden de membrana no se vio afectado luego de la oxidación de ~ 25 % del Col total a colesteno. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Jafurulla y colaboradores (2017), donde observaron que una reducción del Col de membrana del ~ 45 % luego del tratamiento con Cox no produjo cambios en el orden de la misma. Los autores consideraron que, si bien ocurre la oxidación de un grupo hidroxilo del Col, la estructura general de la molécula sigue siendo la misma y ocupa el mismo sitio en la membrana (Jafurulla *et al.*, 2017). Sin embargo, el nAChR sufrió dicha alteración dado que, aún en presencia de carb, el receptor permaneció en un estado conformacional cuyos valores de *KD* para el CrV se corresponden con un estado de reposo, igual a lo observado por enriquecimiento en CHEMS.

Como ya se mencionó, el CrV es un bloqueador de canal abierto que presenta una mayor afinidad por el nAChR muscular en estado D respecto al receptor en estado R (Lurtz y Pedersen, 1999), permitiendo de esta manera detectar y diferenciar estos dos estados. Es importante, entonces, tener en cuenta que este experimento no permite detectar cambios en el estado abierto. Debido a esto, para las condiciones en las que se observó al nAChR estabilizado en valores de reposo, luego de los tratamientos con CHEMS y con Cox, no fue posible determinar si efectivamente el receptor permaneció en un estado R aún en presencia de carb, o si ocurrieron otras posibles situaciones como podrían ser cambios en el tiempo o velocidad de desensibilización del nAChR, o la existencia de estados conformacionales diferentes no detectados por esta técnica.

Para profundizar en el tema y entender el mecanismo molecular que subyace a los cambios observados en los equilibrios conformacionales del nAChR, se estudió la funcionalidad del receptor mediante técnicas de electrofisiología. Se evaluó la activación del nAChR a nivel de canal único utilizando la configuración *cell-attached*, y se midieron corrientes macroscópicas mediante la configuración *whole-cell*.

El efecto del aumento de Col en membrana sobre la funcionalidad del nAChR ya había sido reportado. Báez-Pagán y colaboradores estudiaron mediante corrientes

macroscópicas la funcionalidad de distintos subtipos de nAChR expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, en los cuales se aumentó gradualmente la relación Col/fosfolípidos (Báez-Pagán *et al.*, 2016). La respuesta macroscópica de  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$ , receptor muscular y receptor de *Torpedo californica* se vio reducida cuando los ovocitos se enriquecieron en Col, aunque se observó una mayor reducción en los subtipos de *T. californica* y  $\alpha 7$ . Estos autores postularon que la menor susceptibilidad observada en los receptores muscular y  $\alpha 4\beta 2$  podría indicar un mecanismo por el cual estos dos subtipos de receptores enfrentan las concentraciones crecientes de Col que resultan del envejecimiento (Cohen y Zubenko 1985; Krainev *et al.* 1995; Wood *et al.* 2002). Báez-Pagán y colaboradores propusieron que estos resultados podrían implicar la agregación de los receptores nicotínicos en dominios ricos en Col como consecuencia del aumento de Col de membrana. Estos dominios constituirían un *pool* de receptores no activables, lo que sugiere que las diferencias observadas en los distintos perfiles de inhibición podrían ser explicadas por diferentes afinidades de los receptores estudiados al Col. Santiago y colaboradores (2001) observaron una inhibición de la respuesta macroscópica de receptores de *T. californica* del  $\sim 52\%$  cuando la relación Col/fosfolípidos en ovocitos de *Xenopus* se aumentó de  $\sim 0,51$  a  $0,87$ . Reportaron, además, que el receptor no se recuperó de esta inhibición cuando el exceso de Col fue removido hasta alcanzar valores normales de Col/fosfolípidos, y postularon que la disminución de la respuesta podría deberse a una reducción del número de nAChRs que se encuentran en estado de reposo (Santiago *et al.*, 2001). La disminución de la función de los nAChRs por un aumento del Col ha sido estudiada también por otros autores. Borroni y colaboradores reportaron una disminución del  $33\%$  en el tiempo de estado abierto del canal en registros de canal único luego de la incubación de las células con Col (Borroni *et al.*, 2007). Por lo tanto, aún en condiciones de menor funcionalidad, el equilibrio conformacional no se ve alterado de acuerdo a los resultados de CrV.

En el capítulo I de este trabajo de Tesis se estudió la funcionalidad del nAChR muscular luego del enriquecimiento en CHEMS y de la conversión de parte del Col a colesteno en células BOSC 23 expresando heterológicamente este receptor.

A partir de registros de canal único se observó que el CHEMS genera una modulación negativa del nAChR, con eventos de menor duración, agrupados en *clusters* también de menor duración, y con una baja probabilidad de apertura. Estos resultados, junto con los obtenidos por espectroscopía de fluorescencia con CrV, que mostraron una permanencia del nAChR en estado de reposo, indican que en presencia asimétrica de CHEMS el nAChR es capaz de abrirse en respuesta a la ACh, aunque lo hace con una menor probabilidad de apertura. El CHEMS produce una modulación negativa que podría

ser explicada por dos mecanismos diferentes: i) una disminución de la velocidad de apertura del canal y un aumento de la velocidad de cierre o ii) un bloqueo del receptor.

Si bien los estudios de fluorescencia mostraron resultados similares luego de la incubación con CHEMS o Cox, donde el receptor se encontraba estabilizado en valores correspondientes a una situación de reposo, los resultados de los estudios de funcionalidad fueron diferentes en ambos casos. Luego de la incubación de las células con Cox, los registros de canal único activados por ACh no mostraron diferencias con respecto a la situación control. Las corrientes macroscópicas tampoco mostraron cambios respecto a la condición control en cuanto a las velocidades de activación y de desensibilización. Sin embargo, el tiempo de recuperación de la desensibilización fue más breve en las células tratadas con Cox. Así, una transformación del 25 % del Col a colesteno de la membrana celular permite que el receptor se abra y se desensibilice frente a la presencia del agonista ACh, lo que se condice con lo observado en los registros de canal único. Sin embargo, el nAChR en estas condiciones es capaz de recuperarse de la desensibilización más rápidamente que en una situación control. Aunque todavía no está claro el rol fisiológico de la desensibilización para el nAChR, la recuperación desde el estado desensibilizado podría tener importancia en la latencia requerida para generar otra respuesta luego de una estimulación sináptica (Bouzat y Sine, 2018). Así, un receptor que se recupere más rápido podría considerarse como un receptor que posee ganancia de función.

A partir de los cambios observados en la conformación y funcionalidad del nAChR por alteraciones del Col de membrana, nos propusimos estudiar posibles cambios con respecto a su localización en la misma haciendo foco en su preferencia por dominios Lo, ricos en Col, o dominios Ld, pobres en Col. Para esto, utilizamos como estrategia la resistencia de los dominios *raft* (Lo en sistemas modelo) a la solubilización por Tritón X-100, que permite obtener fracciones DRM y DSM, correspondientes a dominios Lo y Ld, respectivamente. La partición de una molécula en dominios Lo en modelos artificiales de membrana (en general examinados a temperatura ambiente) se suele correlacionar con su aparición en fracciones DRM (obtenidas a 4°C) (Kusumi and Suzuki, 2005). Esta correlación entre las fracciones DRM aisladas y los dominios *raft* resulta a veces controversial, ya que el efecto de los detergentes en las membranas biológicas es muy complejo y en muchos casos los marcadores de estos dominios son segregados espacialmente en distintos compartimentos en la membrana y, por lo tanto, su asociación no reflejaría exactamente la organización *in situ* (Kusumi y Suzuki, 2005; Mayor y Rao, 2004; Lichtenberg *et al.*, 2005). Sin embargo, estos autores coinciden en el hecho de que si una molécula se encuentra en dominios DRM es altamente probable que la misma esté

asociada a dominios *rafts* en la membrana plasmática. Por otro lado, para este experimento se utilizó nAChR de *T. californica* reconstituido en liposomas de POPC:Col:bSM (1:1:1); el hecho de tener una única proteína en el sistema permitió evaluar su localización asegurándonos de que los resultados correspondían efectivamente a la proteína de interés, el nAChR.

Luego de los tratamientos con Col y CHEMS, se observó un aumento significativo de la cantidad de nAChR en la fracción DRM con respecto a la situación control. Esto ocurrió en proteoliposomas de POPC:Col:bSM (1:1:1), a los que se trató con los lípidos mencionados, en proteoliposomas de POPC:Col:bSM (1:2:1) y en proteoliposomas de POPC:Col:bSM:CHEMS (1:1:1:1). Por lo tanto, un aumento en la cantidad de esteroides totales, independientemente de que existiera o no una asimetría de membrana o un mayor orden de la misma, resultó en la localización preferencial del nAChR en las fracciones DRM. Este incremento en la cantidad de nAChR en la fracción DRM (dominios Lo) podría deberse tanto a una mayor cantidad de dominios Lo con igual afinidad del nAChR por ellos, como a un cambio en la composición lipídica de los dominios que se correlacione con una mayor afinidad del nAChR por los mismos, produciéndose, de esta manera, una mayor concentración de receptores en dichos dominios.

Contrario a lo observado con Col y CHEMS, luego del tratamiento con Cox el nAChR se localizó preferentemente en la fracción DSM. Como ya ha sido mencionado, la oxidación del Col de la membrana produce una disrupción de los dominios Lo (Neuvonen *et al.*, 2014). Se podría considerar entonces que el aumento de los receptores en la fracción DSM se debió a una disminución significativa de los dominios Lo, y que el nAChR posee la misma afinidad por dichos dominios que en una situación control. Además, dado que el orden de membrana no se vio modificado en esta condición, es decir luego de la conversión de un 25 % del Col de membrana a colesteno, se puede suponer que, sumado a la menor cantidad de dominios Lo, los dominios Ld presentes poseían un orden de membrana diferente al de la situación control, posiblemente mayor, y que quizás favoreció la presencia de receptores en ellos. De esta manera, el diferente entorno lipídico del nAChR podría explicar los cambios observados en su funcionalidad y equilibrio conformacional.

Para continuar investigando el efecto de la modificación del Col de membrana, se realizaron por último experimentos con GUVs. Los GUVs son sistemas modelo de tamaño celular, y por lo tanto visibles al microscopio, por lo que resultan muy adecuados para el estudio de las membranas biológicas más complejas que involucran heterogeneidades en la composición lipídica, forma y propiedades químicas y mecánicas (Bhatia *et al.*, 2015). Se estudió en primer lugar el efecto de los tratamientos en GUVs de POPC:Col:bSM (1:1:1),

condición que se corresponde con los sistemas modelo utilizados en este trabajo y que, al no presentar dominios microscópicos, permite evaluar si una alteración de la composición lipídica es capaz de alterar el tamaño de los dominios Lo de manera tal que estos sean observables por microscopía.

En las tres condiciones experimentales estudiadas, enriquecimiento en Col, CHEMS o conversión del Col a colesteno, más dos composiciones adicionales, POPC:Col:bSM (1:2:1) y POPC:Col:bSM:CHEMS (1:1:1:1), se observó la aparición de dominios Lo microscópicos. Con respecto a las condiciones de enriquecimiento en Col y CHEMS, los dominios Lo observados podrían explicarse teniendo en cuenta que el incremento de las moléculas de esteroides totales, independientemente de la distribución transbica de las mismas, podría producir ya sea la coalescencia de dominios nanoscópicos o el aumento de su tamaño haciéndolos de esa manera visibles al microscopio. Esto se condice con nuestros resultados de localización del receptor, en los que luego del enriquecimiento en esteroides, de manera simétrica o asimétrica, se observó un aumento de la localización del mismo en dominios Lo.

Un resultado llamativo fue que luego de la incubación con Cox, aun cuando en estas condiciones se había observado una marcada preferencia de localización del nAChR en fracciones DSM (dominios Ld), también se observó la aparición de dominios Lo microscópicos. La oxidación de cerca del 25 % de Col a colesteno provocaría una estructura de membrana diferente produciéndose una migración de las moléculas de colesteno desde los dominios Lo (Xu y London, 2000; Samsonov *et al.*, 2001; Rouquette-Jazdanian *et al.*, 2006; Neuvonen *et al.*, 2014), lo que generaría un intercambio con las moléculas de Col que se encuentren inicialmente en dominios Ld. Si esto ocurriera, ambos tipos de dominios cambiarían tanto su composición como sus propiedades biofísicas. Esto podría llevar a la coalescencia de los dominios Lo nanoscópicos que se mantuvieron luego del tratamiento con Cox.

Con el propósito de estudiar el efecto de distintas alteraciones en el Col de membrana utilizando un modelo de estudio representativo de la interacción nAChR-membrana, y dado que hasta el momento no ha sido posible obtener GUVs conteniendo AChR, se estudió el comportamiento del péptido correspondiente a la porción TM4 de la subunidad y del nAChR reconstituido en GUVs de POPC:Col:eSM (1:1:1), en las que no se observan separación de fases Lo-Ld al microscopio, o de DOPC:Col:eSM (1:1:1) que sí presentan separación de fases visible al microscopio.

En membranas nativas de *T. californica* la relación lípido:proteína es de ~400:1 (Hamouda *et al.*, 2006). En esas condiciones, el receptor permanece en estado de reposo siendo capaz de sobrellevar las transiciones de estado producidas por el agonista, hasta una relación L:P ~65:1. Por debajo de esta relación, hay una disminución de la proporción de nAChRs estabilizados en estado de reposo, y por debajo de ~30:1 el receptor se encuentra totalmente estabilizado en un estado tipo desensibilizado no reactivo al agonista. Teniendo esto en cuenta, para estos estudios se utilizó una relación L:P de 250:1 o 125:1 tanto en GUVs de POPC como de DOPC. En el único caso en que se observaron diferencias con respecto a la situación control fue en los GUVs de POPC:Col:bSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 en una relación L:P 125:1. En esta condición se observó la presencia de dominios Lo, indicando esto que el péptido ocasionó ya sea un aumento del tamaño de los dominios existentes (de dominios nanoscópicos a dominios microscópicos) o la coalescencia de los mismos.

Para estudiar la localización del  $\gamma$ TM4 en estas vesículas, se utilizó la sonda 7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina) que emite fluorescencia cuando reacciona con grupos tioles, en este caso los presentes en el péptido. En GUVs de POPC:Col:eSM (1:1:1) con una relación L:P 250:1, que no presentan separación de fases, no fue posible detectar señal de la cumarina en las membranas. En las vesículas de DOPC:Col:eSM (1:1:1), con la misma relación L:P, sí se detectó señal de fluorescencia de cumarina. Contrariamente a lo publicado anteriormente en donde se propone una localización mayoritaria del péptido  $\gamma$ TM4 en dominios ordenados (de Almeida *et al.*, 2004; Bermúdez *et al.*, 2010), en este caso la señal coincidió con la señal de fluorescencia del DiI-C18, lo que indicaría que el péptido particionaría “preferentemente” en dominios Ld. Sin embargo, analizando en forma conjunta los resultados obtenidos con GUVs conteniendo POPC o DOPC se podría interpretar que la falta de señal en GUVs de POPC con L:P 250:1 se debería a que la cumarina solo puede acceder a dominios Ld, y que en condiciones nanoscópicas la cercanía de dominios Lo impediría el acceso a los dominios desordenados. Por lo tanto, solo se pudieron visualizar los péptidos que se localizaron en entornos más fluidos por lo que no podemos descartar la existencia de péptidos en dominios Lo. Para profundizar en esta idea, se realizaron estudios de temperatura de transición y de FRAP en vesículas de DOPC:Col:eSM (1:1:1) +  $\gamma$ TM4 (L:P 250:1 o 125:1). Los resultados obtenidos sugieren que luego de la incorporación del péptido existe un mayor orden de los lípidos en los dominios Ld, lo que sería consecuencia de la presencia de péptido en estos dominios. Así, los resultados de GUVs con péptidos (como indicador del comportamiento del nAChR) juntos con los obtenidos al estudiar la distribución del nAChR entre dominios

DRM y DSM, indican que el péptido/nAChR lleva a la coalescencia de dominios Lo y que el péptido/nAChR tiene la posibilidad de localizarse en ambos dominios según las características de los mismos.

En resumen, en la condición de un enriquecimiento de  $\sim 50\%$  en Col, los resultados de este trabajo de Tesis no mostraron cambios en cuanto al orden de membrana, aunque sí se observó un aumento de dominios Lo microscópicos. El nAChR se localizó preferentemente en dichos dominios, no observándose modificaciones del estado conformacional del mismo. Aunque no se realizaron experimentos de electrofisiología en esta condición, distintos trabajos postulan que se produce una disminución de su actividad a medida que la relación Col/fosfolípidos aumenta (Santiago *et al.*, 2001; Borroni *et al.*, 2007; Báez-Pagán *et al.*, 2016). Por otro lado, en la condición de enriquecimiento en CHEMS, en la cual se incrementó la cantidad de moléculas de esteroides en un  $\sim 75\%$  generándose, además, una asimetría en la bicapa, se observó un aumento en el orden de membrana y presencia de dominios Lo microscópicos, así como también la localización preferencial del nAChR en dichos dominios. En este caso, la presencia de CHEMS ocasionó perturbaciones en el equilibrio conformacional del nAChR, además de una disminución de su actividad, similar a lo reportado para Col. Finalmente, en la condición de conversión de  $\sim 25\%$  del Col total a colesteno, no se observaron cambios en el orden de membrana, aunque sí se observó la presencia de dominios Lo microscópicos, y una localización preferencial del nAChR en dominios desordenados. El nAChR mantuvo su funcionalidad, aunque su tiempo de recuperación de la desensibilización se redujo, hecho reflejado en el cambio observado del equilibrio conformacional. La posibilidad de localización del nAChR o del péptido en uno u otro dominio según las condiciones de entorno fue observado en los experimentos con GUVs con POPC y DOPC.

Como conclusión general de este Capítulo, existiría una relación inversa entre la presencia de nAChRs en dominios Lo y la funcionalidad de los mismos. A mayor orden de membrana mayor localización de los receptores en dominios Lo y menor actividad. Por otro lado, la presencia de nAChR en dominios desordenados lleva a un aumento de su función. Esta posibilidad que mostró el nAChR de localizarse tanto en dominios Lo como Ld, y la diferente funcionalidad observada en cada localización, estaría confirmando que el nAChR es altamente sensible a su entorno lipídico inmediato, y que el pasaje de uno a otro dominio podría explicar los cambios en la señal colinérgica observados en situaciones de envejecimiento y/o patologías como la EA. El receptor sería funcional en dominios desordenados, y en dominios ordenados estaría inactivo. A medida que aumenta la concentración de Col en la membrana, se produce el reclutamiento de más receptores hacia

dominios Lo llevando a una pérdida de actividad. Báez-Pagán y colaboradores, mediante distintas estrategias experimentales, propusieron que, como consecuencia del aumento de Col de membrana, ocurriría una agregación de receptores nicotínicos en dominios ricos en Col, siendo estos no activables (Báez-Pagán *et al.*, 2017).

Adicionalmente, es importante considerar que, en los tres tratamientos realizados a fin de alterar el Col de membrana, se observó que el receptor en ausencia de agonista estaba en un estado de reposo. Esto estaría sugiriendo que los lípidos no anulares, en íntimo contacto con las subunidades, no fueron alterados, dado que es conocido el requerimiento estricto de Col en dichos sitios para una correcta conformación del nAChR (Brannigan *et al.*, 2008). Posiblemente las moléculas adicionadas de CHEMS, dada la presencia del grupo succinato, no hayan accedido a los sitios no anulares. De igual manera, es poco probable que la enzima Cox haya oxidado las moléculas de Col presentes en sitios no anulares. En este sentido, distintos autores reportaron que el Col es menos susceptible a la oxidación por Cox en presencia de SM (Patzner *et al.*, 1978; Yandouzi and Le Grimellec, 1992; Gimpl *et al.*, 1997), y que, por lo tanto, podría ser posible que la oxidación del mismo ocurra primero en las moléculas que no interaccionan de manera directa con el receptor, seguido esto de una reorganización de la membrana (Jafurulla *et al.*, 2017). Es decir, el nAChR en todas las condiciones mantuvo su conformación activable. Es importante considerar que Hamouda y colaboradores informaron un requerimiento de 35 mol % de Col en membrana, correspondiente con ~ 15 moléculas en el sitio anular del nAChR (3 moléculas de Col por cada subunidad del receptor) (Hamouda *et al.*, 2006). Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, los lípidos anulares serían los responsables de que ocurran los cambios conformacionales asociados al gatillado del canal, y por tanto, la localización del nAChR en un entorno más o menos rígido repercutiría directamente en su funcionalidad.

# **CAPÍTULO II**

## **Modulación del nAChR $\alpha 7$ neuronal por oligómeros de $\beta$ -amiloide**

## INTRODUCCIÓN

La proteína precursora amiloide, APP, a partir del clivaje secuencial por las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa, origina distintos fragmentos peptídicos entre los que se encuentran los péptidos  $A\beta_{1-40}$ , de 40 aminoácidos, y  $A\beta_{1-42}$ , de 42 aminoácidos. En condiciones fisiológicas, este último representa solo el 10 % del péptido producido, pero es el más hidrofóbico y propenso a formar fibrillas (Zhang *et al.*, 2011).

La hipótesis amiloide ha ido cambiando a lo largo del tiempo. Actualmente tiene un gran peso la teoría que enfatiza la importancia de las formas oligoméricas de  $A\beta$  como las causantes de la enfermedad, por sobre las formas insolubles o las monoméricas (Lacor *et al.*, 2004; Shankar *et al.*, 2008; Hayden y Teplow, 2013; Collins-Praino *et al.*, 2014). Algunos estudios han demostrado que los oligómeros de  $A\beta_{1-42}$  inducen daño oxidativo y producen hiperfosforilación de la proteína tau, resultando en efectos tóxicos en las sinapsis y las mitocondrias. Estos consideran a los agregados de  $A\beta$  como los responsables de los daños neuronales y la degeneración vascular en los cerebros de las personas con EA (Kumar *et al.*, 2015).

Como ya se mencionó, otra característica de la EA es la disminución de la actividad colinérgica mediada por el nAChR  $\alpha 7$ . Para contrarrestar este efecto se ha investigado el uso de agonistas parciales y PAMs (Moduladores Alostéricos Positivos) como terapia. Por ejemplo, el tratamiento con drogas que potencian la función colinérgica central ha mostrado aumentar la atención, el rendimiento en el aprendizaje y la memoria en pacientes con EA leve a moderada (Dineley, 2007). La desensibilización rápida del nAChR  $\alpha 7$  hace que tanto los fármacos que aumentan los niveles de ACh como los agonistas totales o parciales que se unen dicho receptor tengan un efecto limitado. Es por eso que la potenciación del nAChR  $\alpha 7$  mediante PAMs puede plantearse como una estrategia terapéutica novedosa para mejorar la memoria y la cognición (Chatzidaki y Millar, 2015; Terry *et al.*, 2015; Echeverría *et al.*, 2016; Bouzat *et al.*, 2018).

Existen numerosas evidencias de interacciones funcionales entre el péptido  $A\beta$  y el nAChR  $\alpha 7$ . Varios estudios han reportado que el péptido  $A\beta$  afecta directamente el funcionamiento del nAChR  $\alpha 7$  a nivel molecular, presentando efectos tanto agonistas como antagonistas (Pettit *et al.*, 2001; Dineley *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Parri *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015; Ma y Qian, 2018). Incluso, se plantea que el tipo de efecto podría depender de la concentración de  $A\beta$ , donde, en

general, a bajas concentraciones (del orden picomolar) actúa como agonista y a altas (nano o micromolares) como antagonista (Mura *et al.*, 2012).

Dado que los oligómeros de A $\beta$  son actualmente considerados las especies asociadas a los cambios en plasticidad sináptica, a la neurodegeneración y a la demencia que se dan en la EA (Lacor *et al.*, 2004; Shankar *et al.*, 2008; Hayden and Teplow, 2013; Collins-Praino *et al.*, 2014; Esparza *et al.*, 2016), en este capítulo de Tesis se estudiaron sus efectos sobre el nAChR  $\alpha 7$ .

## OBJETIVOS

Considerando que una de las características principales de la EA es la pérdida de la señal colinérgica mediada por el nAChR  $\alpha 7$ , y que el A $\beta$  afecta directamente al funcionamiento del nAChR  $\alpha 7$  presentando efectos tanto agonistas como antagonistas, el **OBJETIVO GENERAL** del capítulo II de la Tesis fue estudiar el efecto de oligómeros de A $\beta_{1-40}$  y A $\beta_{1-42}$  sobre el receptor  $\alpha 7$  a nivel molecular.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** de este capítulo fueron:

- Estudiar las posibles alteraciones en el equilibrio conformacional del receptor  $\alpha 7$  en función de la concentración de oligómeros de A $\beta$ .
- Estudiar si los oligómeros de A $\beta_{1-40}$  y A $\beta_{1-42}$ , en ausencia del agonista natural ACh, son capaces de activar el receptor  $\alpha 7$ , en presencia o ausencia del modulador alostérico positivo (PAM) PNU-120596.
- Estudiar si la funcionalidad del receptor  $\alpha 7$  activado por su agonista natural ACh es modificada en función de la concentración de oligómeros de A $\beta_{1-40}$  y A $\beta_{1-42}$  en presencia o ausencia de PNU.

## RESULTADOS

### 1. CAMBIOS CONFORMACIONALES DEL nAChR $\alpha 7$ INDUCIDOS POR OLIGÓMEROS DE A $\beta$

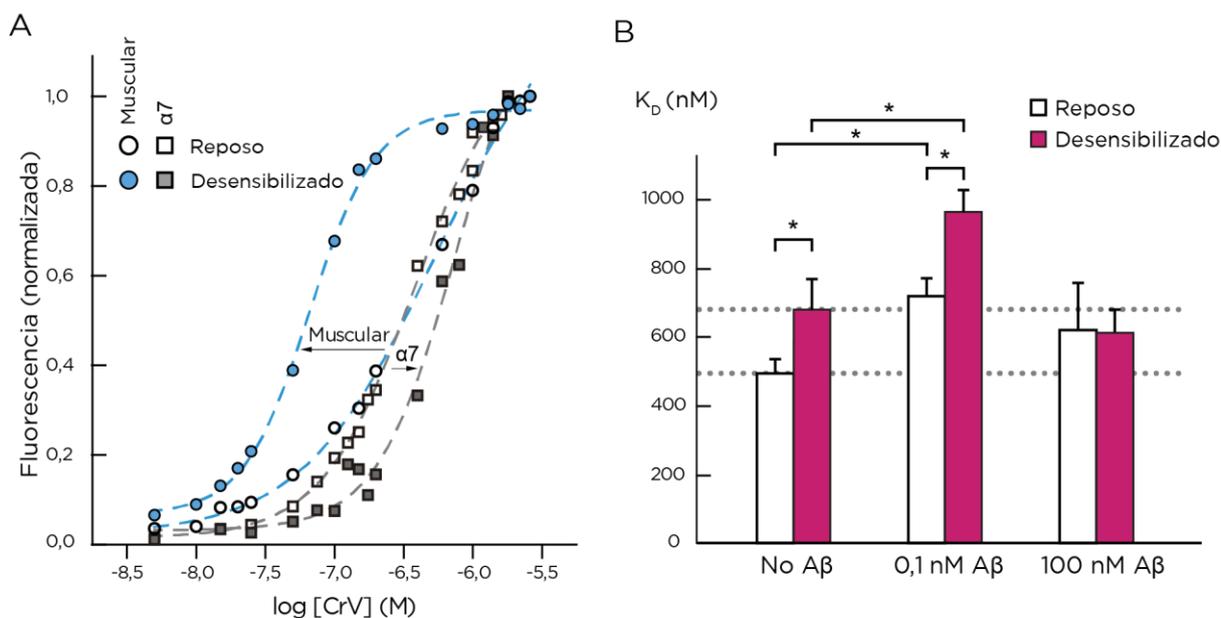
Para estudiar la posibilidad de que los oligómeros de A $\beta$  ocasionen cambios conformacionales en el nAChR  $\alpha 7$ , se realizaron mediciones con la sonda fluorescente CrV.

Hasta el momento, esta sonda solo había sido utilizada para estudios conformacionales del nAChR de *T. californica*. Para ese receptor se observó que el CrV se une con una mayor afinidad si el mismo se encuentra en estado desensibilizado que si se encuentra en estado de reposo, obteniéndose valores de  $KD$  de  $\sim 60$  nM y  $\sim 400$  nM, respectivamente (Fernández Nievas *et al.*, 2008; Perillo *et al.*, 2012; Fabiani *et al.*, 2018) (Figura 1 A).

En este trabajo de Tesis se utilizó la sonda CrV para estudiar por primera vez los estados conformacionales del receptor  $\alpha 7$  humano. Es por esta razón que, en primer lugar, se determinó si esta sonda era capaz de sensar los cambios conformacionales del receptor producidos por carb. Para esto, las células transfectadas con el ADNc de la subunidad  $\alpha 7$  se resuspendieron en PBS y se realizaron titulaciones con concentraciones crecientes de CrV en dos condiciones: en ausencia de carb (donde el receptor se encontraba en estado de reposo) y en presencia de carb 10 mM (donde se favorece el pasaje del receptor al estado desensibilizado).

En la figura 1 A se muestran las curvas obtenidas luego del ajuste de los valores de  $KD$  en función de la concentración de CrV para las dos condiciones estudiadas, llegándose en todos los casos a una saturación del efecto.

El valor de  $KD$  obtenido a partir de la curva para el estado de reposo (Figura 1 A) fue de  $492 \pm 41$  nM, lo que indica una afinidad similar a la del receptor muscular. Sin embargo, el valor de  $KD$  obtenido para el receptor en estado desensibilizado fue  $680 \pm 89$  nM, significativamente diferente al valor de  $KD$  del receptor de *T. californica* en estado desensibilizado ( $p < 0,05$ , Figura 1 A y B).



**Figura 1.** A) Curvas obtenidas luego de la titulación con CrV del nAChR de *T. californica* (círculos) y del nAChR  $\alpha 7$  humano (cuadrados) en ausencia (reposo) o presencia de carb (desensibilizado). Las flechas indican el cambio desde la condición de reposo a la condición desensibilizada para cada tipo de nAChR. B) Cambios en los valores de  $K_D$  del CrV en ausencia y luego de la exposición a bajas (0,1 nM) o altas (100 nM) concentraciones de A $\beta$  1-40. Los valores fueron calculados a partir de las curvas de titulación, en ausencia y presencia de 10 mM de carb (columnas blancas y rosas, respectivamente). Cada columna corresponde a la media  $\pm$  D.S. de por lo menos 4 experimentos independientes. “\*”=  $p < 0,05$ .

Los resultados obtenidos indican, por un lado, que el CrV satura sus sitios de unión al receptor  $\alpha 7$  tanto en estado de reposo como en estado desensibilizado. No obstante, las diferentes afinidades son inversas al perfil de unión para el receptor muscular, ya que el CrV se une al receptor  $\alpha 7$  con mayor afinidad cuando este se encuentra en estado de reposo que cuando se encuentra desensibilizado. Las intensidades máximas de fluorescencia de las muestras fueron similares en ambas condiciones, descartando esto la posibilidad de que la menor afinidad por el nAChR en estado desensibilizado pueda deberse a una reducción de la unión de la sonda en este último estado.

Estos primeros experimentos demostraron que la sonda CrV puede ser utilizada para detectar cambios conformacionales en equilibrio en el receptor  $\alpha 7$  y además indicaron diferencias conformacionales entre los estados desensibilizados del nAChR muscular y el nAChR  $\alpha 7$ .

Una vez determinada la capacidad del CrV de diferenciar estados conformacionales en el nAChR  $\alpha 7$ , se determinaron los efectos de concentraciones bajas (100 pM) y altas (100 nM) de A $\beta$ <sub>1-40</sub> sobre la conformación del receptor  $\alpha 7$ . Para esto se estudiaron los

valores de  $KD$  del CrV para el receptor en estado de reposo y en estado desensibilizado en las diferentes condiciones experimentales (Figura 1 B).

Cuando el receptor  $\alpha 7$  en estado de reposo (en ausencia de carb) se incubó con oligómeros de  $A\beta_{1-40}$  a baja concentración (100 pM), se observó un incremento de los valores de  $KD$  hacia valores correspondientes al estado desensibilizado, indicando que los péptidos amiloides inducen cambios conformacionales en  $\alpha 7$ . El agregado posterior de carb produjo un desplazamiento aún mayor hacia valores más altos de  $KD$ , sugiriendo esto que, cuando el agonista se encuentra junto con el péptido  $A\beta$ , se puede inducir un nuevo estado conformacional (Figura 1 B). Resultados similares se obtuvieron con oligómeros de  $A\beta_{1-42}$  a la misma concentración (100 pM).

La incubación de los receptores en estado de reposo con concentraciones 1000 veces mayores (100 nM) de  $A\beta_{1-40}$  mostró resultados diferentes a los observados a bajas concentraciones, dado que no se observaron cambios significativos en los valores de  $KD$  del CrV. Además, los valores de  $KD$  permanecieron constantes, incluso luego del agregado de 20 mM de carb, indicando así que el nAChR  $\alpha 7$  no fue reactivo a la adición de agonista. Resultados similares se obtuvieron con  $A\beta_{1-42}$  100 nM (Figura 1 B).

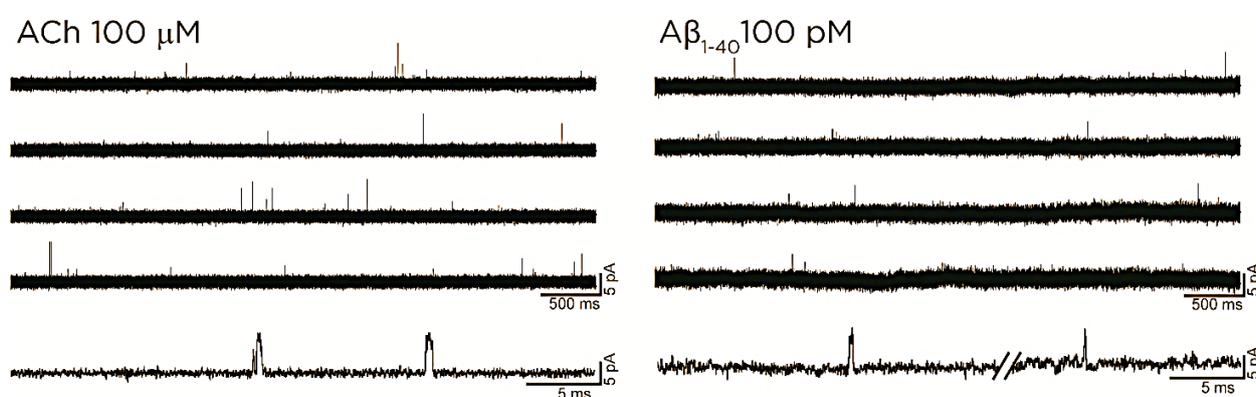
## 2. ACTIVACIÓN DEL nAChR $\alpha 7$ NEURONAL POR OLIGÓMEROS DE $A\beta$

Luego de establecer que el  $A\beta$  oligomérico provoca cambios conformacionales en el receptor  $\alpha 7$ , realizamos registros de canal único para intentar explicar el mecanismo subyacente a dichos efectos. Los registros electrofisiológicos fueron realizados en conjunto con el Dr. Matías Lasala.

Para determinar si los oligómeros de  $A\beta$  tienen la capacidad de activar al receptor  $\alpha 7$ , se realizaron registros de canal único en presencia de  $A\beta$  y ausencia de ACh. En primer lugar, se realizaron registros a modo de control en presencia de 100  $\mu$ M de ACh. En estas condiciones, el receptor  $\alpha 7$  presentó aperturas individuales muy breves separadas por cierres largos; o, menos frecuentemente, pocas aperturas en rápida sucesión separadas por cierres breves, llamadas *bursts* (Figura 2). La media de la duración de los eventos de apertura fue de  $0,36 \pm 0,07$  ms y la duración media de los *bursts* fue de  $0,77 \pm 0,21$  ms. No se observó actividad de  $\alpha 7$  en ausencia de agonista.

En presencia de 100 pM de oligómeros de  $A\beta_{1-40}$  (y ausencia de ACh) se detectaron eventos de apertura breves típicos, similares a los detectados en presencia del agonista (Figura 2). En la mayoría de los registros (correspondientes a un sello en una célula) no se

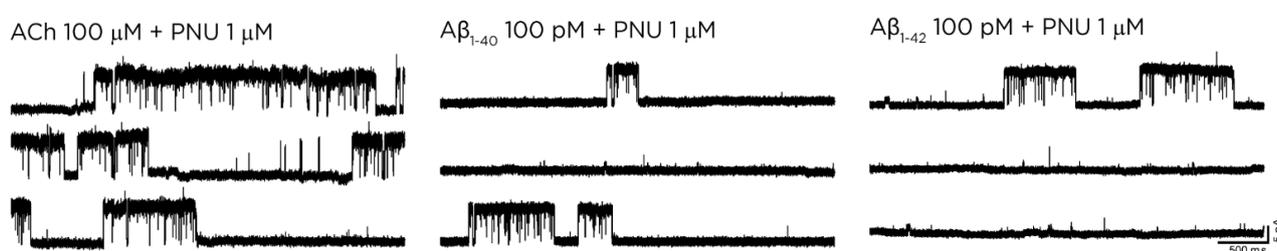
observaron canales, solo 2 registros (de un total de 8 experimentos) presentaron actividad con una reducida frecuencia de aperturas. Al aumentar la concentración de péptido a 100 nM no se detectó actividad en ninguno de los registros, lo que indica que la activación se produce a bajas concentraciones de A $\beta$ .



**Figura 2.** Registros de canal único del receptor  $\alpha 7$  obtenidos en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de ACh o 100 pM de A $\beta_{1-40}$ . Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. Para cada condición se muestra, además, un trazo a mayor resolución temporal (abajo).

Debido al bajo porcentaje de sellos con actividad y a la baja frecuencia de los eventos detectados, los mismos experimentos se realizaron en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de PNU. Este compuesto es un PAM tipo II que, al aumentar la posibilidad de apertura del canal, favorece la detección de eventos de apertura poco frecuentes.

En presencia de ACh y PNU, la activación se observa como largos episodios que llamamos *clusters*. Cada *cluster*, a su vez, está compuesto por dos o tres *bursts* que contienen aperturas de larga duración separadas por cierres breves (DaCosta *et al.*, 2011). La duración media del *cluster* en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de ACh y 1  $\mu\text{M}$  de PNU fue de  $2263 \pm 990$  ms (Figura 3, Tabla 1).



**Figura 3.** Registros de canal único del receptor  $\alpha 7$  en presencia de ACh y PNU, o A $\beta_{1-40}$  o A $\beta_{1-42}$  y PNU. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. Se muestran trazos representativos de un registro para cada una de las condiciones indicadas

Para determinar si existe una dependencia de la concentración de A $\beta$  (en presencia de PNU), se realizaron registros con distintas concentraciones del péptido. Nuevamente, la proporción de sellos con actividad fue menor que la esperada en presencia de ACh: más del 95 % de los registros mostraron actividad cuando se utilizó ACh como agonista, mientras que el porcentaje de los registros con actividad fue del 42 % y 77 % en presencia de 100 pM de A $\beta_{1-40}$  y 100 pM de A $\beta_{1-42}$ , respectivamente (Tabla 1). Además, se observó que, a medida que se incrementó la concentración de A $\beta$ , disminuyó el número de sellos que mostraron activación de  $\alpha 7$ . A 100 nM no se detectó actividad  $\alpha 7$  producida por A $\beta$ , tanto para A $\beta_{1-40}$  como para A $\beta_{1-42}$ . Concentraciones bajas (100 pM) de A $\beta_{1-40}$  y A $\beta_{1-42}$  produjeron la activación del receptor  $\alpha 7$ , detectándose en los registros de canal único los *clusters* típicos que se observan en presencia de ACh y PNU (Figura 3). En la mayoría de las concentraciones testeadas no se detectaron diferencias significativas en la duración media del *cluster*, salvo para 10 nM de A $\beta_{1-40}$ , en donde la duración resultó ser más larga (Tabla 1). Estos resultados muestran que, incluso en presencia de un PAM, A $\beta$  en concentraciones picomolar o nanomolar bajas produce la activación de los receptores  $\alpha 7$ .

[ACh] ( $\mu$ M)	A $\beta$	[A $\beta$ ] (nM)	% de sellos con actividad (n)	Duración media del <i>cluster</i> (ms)
100	---	0	100 (6)	2263 $\pm$ 990
0	A $\beta_{1-40}$	0,1	42,9 (7)	762 $\pm$ 316
0		1	22,2 (18)	2016 $\pm$ 1364
0		10	30 (10)	<b>5229 <math>\pm</math> 1392*</b>
0		100	0 (9)	-
0	A $\beta_{1-42}$	0,1	77,8 (9)	1401 $\pm$ 805
0		1	46,2 (13)	1208 $\pm$ 946
0		10	33,3 (9)	1751 $\pm$ 766
0		100	0 (6)	-

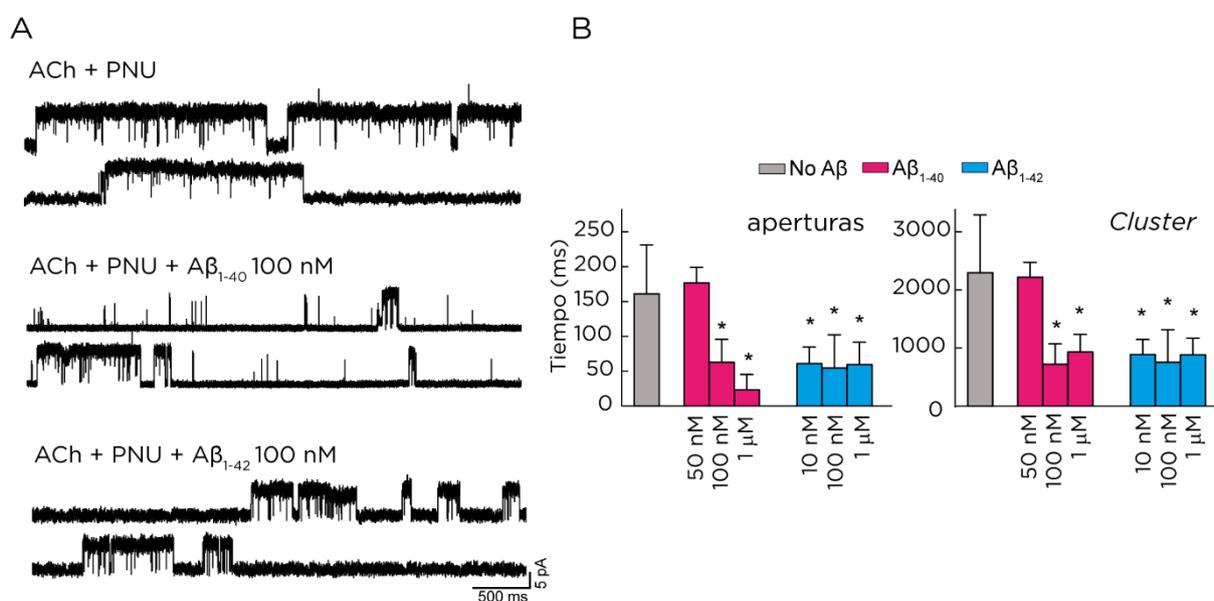
**Tabla 1.** Duración media de los *clusters* del receptor  $\alpha 7$  activado por ACh o A $\beta_{1-40}$  o A $\beta_{1-42}$ , en presencia de PNU 1  $\mu$ M. Los datos representan la media  $\pm$  D.S. “\*” =  $p < 0,001$ .

### 3. CAMBIOS EN LA ACTIVACIÓN DEL nAChR $\alpha 7$ NEURONAL POR OLIGÓMEROS DE A $\beta$ EN ALTAS CONCENTRACIONES

Para evaluar el efecto del A $\beta$  sobre la duración de los episodios de apertura del receptor  $\alpha 7$  provocados por el agonista ACh, se estudió la acción combinada de A $\beta$  con ACh sobre dicho receptor.

En primer lugar, se realizaron registros de canal único activados por 100  $\mu$ M de ACh en presencia de A $\beta_{1-40}$  (10 y 100 nM). Si bien las diferencias con respecto al control no fueron estadísticamente significativas, la duración media de las aperturas y los *bursts* a ambas concentraciones fue ligeramente menor que la del control (Tabla 2). Dado que las duraciones de los eventos de apertura son muy breves, las diferencias en estos valores pudieron no ser del todo precisas ya que se acercan al límite de resolución del sistema utilizado. Para superar este inconveniente, se estudió el efecto del A $\beta$  (10 nM - 1  $\mu$ M) en canales activados por ACh en presencia de 1  $\mu$ M de PNU.

En estas condiciones, tanto A $\beta_{1-40}$  como A $\beta_{1-42}$  a altas concentraciones produjeron una reducción estadísticamente significativa de la duración del componente más lento de las aperturas individuales y de los *clusters* detectados en presencia de ACh y PNU, a aproximadamente un tercio del valor control en cada caso. Esto fue, además, dependiente de la concentración del péptido (Figura 4 A). Cuando se trabajó con A $\beta_{1-42}$ , esta reducción se observó a partir de una concentración 10 nM, mientras que para el caso de A $\beta_{1-40}$ , se pudo observar a concentraciones mayores, a partir de 100 nM (Figura 4 B, Tabla 2).



**Figura 4.** A) Registros de canal único del receptor  $\alpha 7$  en las distintas condiciones. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. B) Variaciones en la media de las duraciones de tiempo de apertura y *cluster* por la presencia de A $\beta$ . Cada columna corresponde a la media  $\pm$  D.S. de por lo menos 3 registros independientes. “\*” =  $p < 0,001$ .

PAM	A $\beta$	A $\beta$ (nM)	n	Duración media apertura (ms)	Duración media burst/cluster (ms)
No	No	0	3	0,36 $\pm$ 0,07	0,77 $\pm$ 0,21
	A $\beta_{1-42}$	10	3	0,26 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,06
		100	3	0,27 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,11
PNU-120596 1 $\mu$ M	No	0	6	159,6 $\pm$ 69,6	2263 $\pm$ 990
	A $\beta_{1-40}$	50	3	176,7 $\pm$ 22,5	2220 $\pm$ 256
		100	5	<b>61,6 <math>\pm</math> 33,1*</b>	<b>698 <math>\pm</math> 409*</b>
		1000	3	<b>23,4 <math>\pm</math> 22,0*</b>	<b>931 <math>\pm</math> 303*</b>
	A $\beta_{1-42}$	10	5	<b>61,1 <math>\pm</math> 23,8*</b>	<b>888 <math>\pm</math> 261*</b>
		100	5	<b>54,7 <math>\pm</math> 47,8*</b>	<b>755 <math>\pm</math> 560*</b>
		1000	6	<b>59,6 <math>\pm</math> 32,2*</b>	<b>883 <math>\pm</math> 289*</b>

**Tabla 2.** Duración de los episodios de activación en presencia o ausencia de A $\beta$ , potenciados o no por PNU. En todos los casos la activación del receptor  $\alpha 7$  se realizó con 100  $\mu$ M de ACh. Los datos representan la media  $\pm$  D.S. “\*\*” = p<0,001.

De esta manera, concluimos que la duración de los episodios provocados por ACh y potenciados por PNU es reducida por oligómeros de A $\beta$ .

## DISCUSIÓN

Unas de las características de la EA es el hecho de que los péptidos A $\beta$ , que en el cerebro de personas sanas se encuentran en concentraciones picomolares cumpliendo roles fisiológicos, alcanzan concentraciones nanomolares causando la formación de placas insolubles, una de las principales condiciones de esta patología (Dineley, 2007; Parihar y Brewer, 2010; Puzzo *et al.*, 2015). Otra de las características de esta enfermedad es el déficit colinérgico severo, que involucra principalmente a los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$ .

El receptor  $\alpha 7$  ha demostrado tener una alta afinidad por el A $\beta$ . Esta interacción podría influenciar la transmisión sináptica y la plasticidad neuronal, e incluso contribuir a la disfunción de las redes neuronales y al déficit colinérgico que ocurre en esta patología (Wang, 2000; Buckingham *et al.*, 2009; Dineley *et al.*, 2015; Hascup y Hascup, 2016). El mecanismo molecular por el cual el A $\beta$  afecta la actividad del receptor ha sido estudiado principalmente a nivel de corrientes macroscópicas y aún no es del todo conocido. En este capítulo de este trabajo de Tesis, se utilizaron las ventajas de dos técnicas diferentes para dilucidar las bases moleculares de la acción o efecto del A $\beta$  sobre el nAChR  $\alpha 7$ .

Hasta el momento de este trabajo, la sonda CrV solo había sido utilizada para estudios en receptor de *T. californica* (Fernández Nievas *et al.*, 2008; Perillo *et al.*, 2012; Fabiani *et al.*, 2018) y no se había aplicado para el receptor  $\alpha 7$ . Esta sonda permite detectar estados conformacionales en equilibrio, como son los estados en reposo y desensibilizado. Dado que el estado abierto es rápido y breve, no puede ser detectado.

El primer objetivo fue determinar si el CrV podía diferenciar entre estados de reposo y desensibilizado en el receptor  $\alpha 7$ , como ocurre en el nAChR muscular. Un resultado importante que se obtuvo es la demostración de que la sonda fluorescente CrV puede ser utilizada para detectar cambios conformacionales en el receptor  $\alpha 7$  neuronal. Además, demostramos que la unión del CrV al receptor muscular y al  $\alpha 7$  presenta diferentes perfiles. En el nAChR muscular, el CrV presenta una mayor afinidad por el receptor en estado desensibilizado con respecto al estado de reposo, mientras que en el receptor  $\alpha 7$  la situación es inversa. La sonda CrV se comporta como un antagonista no-competitivo localizándose en el vestíbulo del canal (Lurtz y Pedersen, 1999). Nuestros resultados demostraron que la conformación de la región vestibular es similar para ambos receptores en estado de reposo, pero no así para los receptores en estado desensibilizado. De esta manera, los cambios conformacionales producidos por una exposición prolongada a la carb son diferentes para el nAChR muscular que para el nAChR  $\alpha 7$ . En resumen, el uso de la sonda CrV ha demostrado ser útil para revelar arreglos estructurales específicos

de los distintos subtipos de receptores asociados con distintos estados conformacionales, y abre una puerta para realizar más estudios en este sentido.

Los cambios conformacionales del receptor  $\alpha 7$  provocados por la presencia de A $\beta$  fueron detectados utilizando la sonda CrV. A una concentración baja, de 100 pM, el A $\beta$  oligomérico ocasionó un cambio conformacional en el receptor, obteniéndose valores de *KD* similares a los valores obtenidos para el receptor en estado desensibilizado. Luego de la adición de carb a la condición anterior, se obtuvieron valores de *KD* aún mayores que los obtenidos para el receptor en estado desensibilizado. Esto permitió sugerir que existe al menos otro estado conformacional del receptor que puede ser detectado por el CrV, al que se llega luego de la incubación con 100 pM de A $\beta$  y carb. A pesar de que este método solo permite sensar conformaciones en equilibrio y no da información sobre el estado abierto del receptor, el hecho de que en presencia de A $\beta$  el receptor  $\alpha 7$  siga respondiendo a carb se condice con la inducción tanto de estados de apertura como de desensibilización. La conformación del nAChR  $\alpha 7$  en presencia de concentraciones bajas de A $\beta$  y altas de carb es diferente a la del estado desensibilizado (concentraciones altas de carb en ausencia de A $\beta$ ), indicando esto la inducción de un nuevo estado conformacional. Además, dado que los efectos de A $\beta$  a bajas concentraciones y en presencia de carb observados sobre la conformación del receptor  $\alpha 7$  se sumaron, ambas moléculas estarían actuando en sitios diferentes, y por lo tanto el A $\beta$  se estaría comportando como un modulador alostérico del receptor. Sin embargo, a una alta concentraciones de A $\beta$ , 100 nM, no se detectaron cambios conformacionales del nAChR  $\alpha 7$  con respecto a la situación de reposo control, hecho que no se revertió por adición de altas concentraciones de carb, sugiriendo que en estas condiciones el nAChR  $\alpha 7$  se encontraría en un estado menos activable.

Por otro lado, los resultados de canal único también permitieron confirmar el efecto dual de A $\beta$  dependiente de su concentración. Dos características de la activación del receptor  $\alpha 7$  son los eventos de apertura muy breves (en la escala de los microsegundos) y la rápida desensibilización (Bouzat *et al.*, 2008; Corradi y Bouzat, 2016). Encontramos que el A $\beta$  es capaz de provocar la activación de este receptor tanto en ausencia como en presencia del PAM de tipo II PNU-120596. En ambas condiciones, la activación por A $\beta$  se produjo a 100 pM o a concentraciones nanomolares bajas, mientras que no se detectó actividad a concentraciones micromolares, en concordancia con los resultados de corrientes macroscópicas reportados previamente en ovocitos (Dineley *et al.*, 2002, 2015) y con nuestros resultados de CrV (Lasala *et al.*, 2019). La actividad provocada por el péptido A $\beta$  fue significativamente menor con respecto a la provocada por ACh, tanto en términos del número de sellos que mostraron actividad como de la frecuencia de aperturas dentro de

un registro, indicando que es menos efectivo que el agonista para producir la activación. De todos modos, cuando se produjo la apertura del canal, la duración media de las aperturas de los *clusters* fueron similares a las provocadas por ACh. Por lo tanto, la capacidad de A $\beta$  a bajas concentraciones, compatibles con las encontradas en individuos sanos, para activar el receptor  $\alpha 7$  podría explicar su rol fisiológico beneficioso propuesto (Puzzo *et al.*, 2015).

Distintos estudios han mostrado que concentraciones altas de A $\beta$  poseen un efecto inhibitorio en la amplitud de las corrientes macroscópicas generadas por el receptor  $\alpha 7$ , como también en las vías de señalización (Dineley *et al.*, 2002; Parri *et al.*, 2011). De acuerdo con estos resultados, encontramos que, en presencia de PNU, la duración media de los episodios de activación (*bursts* o *clusters*), como así también la duración de las aperturas individuales del canal, se ven significativamente reducidas por concentraciones altas de A $\beta$  oligomérico. Desde un punto de vista mecanístico, la menor duración de los *clusters* y de las aperturas podría ser compatible con un aumento en la desensibilización y/o un bloqueo del canal. El bloqueo rápido del canal abierto puede ser descartado, ya que los cierres breves correspondientes a aperturas bloqueadas (*flickering*) no fueron observados.

El aumento en la desensibilización y el bloqueo lento del canal son procesos difíciles de distinguir mediante técnicas de electrofisiología (Arias *et al.*, 2009; Bouzat y Sine, 2018). Los experimentos utilizando la sonda fluorescente CrV mostraron que a altas concentraciones de A $\beta$ , el receptor  $\alpha 7$  adopta un estado conformacional similar al estado de reposo en términos de los valores de *KD* del CrV. Además, desde este estado el receptor no responde a la adición de carb. En concordancia con estas observaciones, en otra línea de experimentos desarrollados en el próximo capítulo se vio que el bloqueador de canal abierto QX-314 no cambió el valor de *KD* de CrV para el estado de reposo del nAChR muscular, y que este valor permaneció constante incluso en presencia de altas concentraciones de carb (Fabiani *et al.*, 2018). Por lo tanto, se puede inferir que el A $\beta$  oligomérico a altas concentraciones se comporta como un bloqueador lento de canal del receptor  $\alpha 7$ . La disminución de la actividad del receptor  $\alpha 7$  en presencia de A $\beta$  podría contribuir al déficit de señalización colinérgica y por lo tanto estar involucrado en el inicio y desarrollo de la EA. Estos resultados están de acuerdo con el buscado rol protector de la estimulación de la actividad del receptor  $\alpha 7$  para el tratamiento del daño cognitivo y de la memoria asociados a enfermedades neurológicas como la EA (Inestrosa *et al.*, 2013; Lendvai *et al.*, 2013; Wallace y Bertrand, 2013; Uteshev, 2014; Dineley *et al.*, 2015; Corradi y Bouzat, 2016; Yang *et al.*, 2017).

El sitio de unión de A $\beta$  al receptor  $\alpha 7$  permanece aún sin conocerse. Estudios de *docking* sugieren que el péptido podría interactuar con el sitio de unión al agonista en las interfases entre subunidades (Espinoza-Fonseca, 2004), proponiendo que la tirosina 188 en el *loop* C de este sitio estaría involucrada en la activación del receptor  $\alpha 7$  por A $\beta$  (Tong *et al.*, 2011). Por otra parte, se postuló que la cavidad transmembrana, un sitio de unión para diferentes ligandos alostéricos de la familia de receptores *Cys-loop* (Young *et al.*, 2008; Sauguet *et al.*, 2015; Corradi y Bouzat, 2016) estaría involucrada en el bloqueo no competitivo por A $\beta$  de receptores  $\alpha 4\beta 2$  (Pandya and Yakel, 2011). Los resultados de espectroscopía de este capítulo demuestran que en presencia de bajas concentraciones de A $\beta$  el nAChR  $\alpha 7$  sigue siendo reactivo a carb, sugiriendo esto que el A $\beta$  no ocupa el sitio ortostérico de unión al agonista y, por lo tanto, la activación ocurriría a través de sitios alostéricos. La activación alostérica de  $\alpha 7$  a través de un sitio transmembrana se ha demostrado para 4BP-TQS aunque con un perfil de activación muy diferente al de la ACh (Gill *et al.*, 2011; Lasala *et al.*, 2018). Alternativamente, el A $\beta$  podría ser capaz de activar al receptor sin ocupar los cinco sitios ortostéricos de agonista; los sitios restantes, ocupados luego por carb, podrían favorecer la activación y desensibilización. Esta posibilidad se condice con estudios previos que demostraron que la ocupación de solo uno de los sitios de activación del agonista es suficiente para la activación del receptor  $\alpha 7$  (Andersen *et al.*, 2013). A altas concentraciones, A $\beta$  podría inhibir a  $\alpha 7$  actuando a través de un sitio alostérico, diferente del sitio que ocupa el CrV en el poro del canal, dado que no interfiere con su unión. Las acciones duales como agonistas de baja eficacia y bloqueadores de canales se han descrito para varios compuestos, actuando en diferentes sitios de los nAChRs (Bouzat and Mukhtasimova, 2018; Bouzat and Sine, 2018, Fabiani *et al.*, 2018).

En conclusión, los resultados de este capítulo proveen información desde una perspectiva molecular para comprender las acciones complejas del A $\beta$  a nivel celular. A concentraciones picomolar o nanomolar bajo, compatibles con las encontradas en individuos sanos, los oligómeros son activadores del nAChR  $\alpha 7$  y podrían tener un rol beneficioso. A concentraciones nanomolar altas o micromolar, compatibles con las encontradas en pacientes de EA, los oligómeros son inhibidores del nAChR  $\alpha 7$  y podrían contribuir a la deficiencia en memoria y cognición de esta enfermedad.

# **CAPÍTULO III**

## **Modulación del sistema colinérgico por la cafeína y sus derivados sintéticos**

## INTRODUCCIÓN

El hallazgo de un nuevo principio activo puede realizarse por síntesis química en el laboratorio o por aislamiento de sustancias existentes en la naturaleza, provenientes de plantas, animales, microorganismos o minerales. Esta búsqueda de nuevas sustancias útiles para el ser humano a partir de productos naturales se denomina bioprospección (Atanasov *et al.*, 2015). Todos los compuestos químicos presentes en la naturaleza cumplen una función biológica en el organismo en el que se encuentran. Especialmente interesantes son los metabolitos secundarios, que si bien no cumplen funciones esenciales, su presencia es consecuencia de una estrategia adaptativa del organismo a condiciones del ambiente en el que éste se desarrolla. Adicionalmente, los compuestos naturales presentan ciertas ventajas sobre las drogas sintéticas tales como menor toxicidad, facilidad para atravesar la barrera hematoencefálica, muchos efectos sinérgicos (Kamal *et al.*, 2015) y estructuras complejas muy difíciles de vislumbrar, diseñar y/o obtener por síntesis químicas. Por estos motivos, entre otros, han sido durante siglos la principal fuente de agentes medicinales, siendo su búsqueda una tarea continua desde tiempos prehistóricos hasta nuestros días. Una de las estrategias más utilizada para el descubrimiento de nuevas moléculas activas en la naturaleza es la etnomedicina, que se centra en el estudio de plantas u otros organismos que tradicionalmente se han usado para el tratamiento de distintas patologías. El uso milenario de distintas plantas, acompañado de la exhaustiva bioprospección realizada por distintos grupos humanos en la zona en la que habitan, apoya fuertemente su mayor estudio en busca de los principios activos que puedan explicar su uso. Estos principios activos pueden ser el punto de partida para el diseño de nuevos fármacos.

El compuesto activo que se encuentra en la naturaleza, denominado molécula líder, molécula madre o prototipo, generalmente no es el fármaco óptimo para un determinado uso, dado que sumado a su actividad biológica de interés puede presentar efectos no deseados, efectos secundarios, toxicidad y complicaciones desde el punto de vista farmacocinético, entre otras. Es por ello que, luego de la identificación de un principio activo, se realiza la optimización del mismo mediante estudios de relación estructura-actividad (estrategias *SAR*, por sus siglas en inglés). El diseño de las modificaciones químicas partiendo de la molécula líder puede seguir distintos criterios según el objetivo buscado.

Los seres humanos han hecho uso de la naturaleza para satisfacer distintas necesidades básicas, entre las que se encuentra el tratamiento de enfermedades desde tiempos inmemorables. Durante largo tiempo las plantas constituyeron la única fuente de

medicamentos existente para el hombre (Cragg y Newmann, 2010), y la ciencia moderna le asigna un valor cada vez mayor a la naturaleza y a la cantidad de compuestos bioquímicos que a partir de ella se pueden obtener. El número de compuestos naturales que se utilizan, no solo en la industria farmacéutica sino también en las industrias alimenticia y cosmética, entre varias otras, es cada vez mayor (Navanesan *et al.*, 2015). Actualmente, los principios activos de origen natural representan una gran parte de los fármacos utilizados (alrededor del 50 %).

Una gran cantidad de plantas utilizadas en la medicina tradicional han demostrado mejorar las funciones colinérgicas y las funciones cognitivas actuando como inhibidores de la ACE (Ahmed *et al.*, 2013). Es por esto que existe un interés cada vez mayor en la investigación de distintas especies utilizadas tradicionalmente en la medicina popular para el tratamiento y prevención de la EA y otras enfermedades neurodegenerativas. Entre las especies de plantas a las que se le han asignado distintas propiedades medicinales, para el trabajo de esta Tesis se eligieron el boldo (*Peumus boldus*), laurel (*Laurus nobilis*), poleo (*Lippia turbinata*), romero (*Rosmarinus officinalis*), té (*Camellia sinensis*) y tilo (*Tilia platiphyllos*), a fin de encontrar principios activos interesantes para la EA. Sus usos tradicionales se describen a continuación:

1. Boldo (*P. boldus*). Es una planta mundialmente valorada por sus efectos medicinales, la infusión preparada a partir de sus hojas consta de muy diversas propiedades beneficiosas. Las más conocidas son sus propiedades estimulantes sobre el funcionamiento de la vesícula biliar y sus propiedades protectoras sobre el hígado, además de su efecto tonificante y protector del estómago y el sistema digestivo. Estas propiedades se deberían esencialmente a la boldina, alcaloide principal de esta planta, y a distintos compuestos presentes en el aceite esencial. También se le atribuyen propiedades potenciadoras del sistema inmune, e importantes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Además, ayudaría a combatir el insomnio, el nerviosismo, el estrés y la ansiedad, atribuyéndosele un efecto sedante y ligeramente anestésico (Cederbaum *et al.*, 1992; Gotteland *et al.*, 1995; Chuliá *et al.*, 1996; Jang *et al.*, 2000; Kubínová *et al.*, 2001; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2003; Villar del Fresno y Gómez-Serranillos, 2006).

2. Laurel (*L. nobilis*). Es un árbol conocido popularmente por poseer diversas propiedades medicinales. Se considera que la infusión preparada a partir de sus hojas tiene propiedades digestivas, protege al hígado y al estómago previniendo la acidez y disminuyendo los espasmos intestinales. Posee un efecto beneficioso contra la gripe, la tos, la bronquitis y las afecciones del aparato respiratorio en general. Además, se le han

asignado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Sayyah *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006; Speroni *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2019).

3. Poleo (*L. turbinata*). Sus propiedades beneficiosas han sido aprovechadas desde la antigüedad. La infusión preparada a partir de sus hojas puede utilizarse para el tratamiento de dolores de estómago producidos por malas digestiones, se le asigna además la capacidad de estimular al hígado aumentando la secreción de bilis, lo que favorece la digestión. Se le atribuyen propiedades expectorantes y benéficas en tratamientos contra la gripe y resfriados. Por otro lado, ayudaría a mejorar la circulación sanguínea utilizándose contra el “mal de altura” (Pascual *et al.*, 2001).

4. Romero (*R. officinalis*). El té de romero es la forma más utilizada para administrar sus beneficios medicinales. Se han descrito efectos digestivos y protectores del hígado, propiedades diuréticas y antiictéricas así como también analgésicas y bactericidas. Es un poderoso antioxidante. Se le atribuye la capacidad de aliviar dolores articulares, óseos y musculares, de mitigar migrañas y dolores de cabeza, de aliviar la ansiedad y de promover el bienestar en general. Uno de los usos más interesante del romero es debido a las propiedades que se le asignan sobre las células cerebrales, haciéndolas más eficientes para aprovechar el oxígeno proveniente de los pulmones. Esta propiedad tendría como efecto principal una marcada mejoría en la concentración y la memoria, y una disminución considerable de la fatiga mental (al-Sereiti *et al.*, 1999; Kennedy y Scholey, 2006; Cheung and Tai, 2007; Hsieh *et al.*, 2007; Scheckel *et al.*, 2008; Yesil-Celiktas *et al.*, 2010; Karthik *et al.*, 2011; Kayashima y Matsubara, 2012; Ramadan *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014; de Oliveira *et al.*, 2019).

5. Té rojo (*C. Sinensis*). El té es la segunda bebida más consumida del mundo, luego del agua. Originario de China, son miles los años que respaldan sus numerosas propiedades y beneficios. Hay tés de múltiples colores, sabores y aromas, entre los que se destacan cuatro tipos: té verde, té rojo, té blanco y té negro. En este trabajo de Tesis se utilizó el té rojo, que es una variedad semifementada (entre el té verde y el té negro). El té rojo es muy beneficioso para la salud, ya que se le atribuyen propiedades antioxidantes, efectos protectores del sistema cardiovascular, propiedades beneficiosas frente a procesos malignos y se lo considera óptimo para el tratamiento de la obesidad debido a su efecto “anti grasa” (Sharangi *et al.*, 2009).

6. Tilo (*T. platiphyllus*). Es una planta que se consume en todo el mundo, fundamentalmente como infusión, y que posee amplias propiedades medicinales. Se lo considera un antiespasmódico, que relaja los músculos y alivia el estrés. Es popularmente conocido por ser un poderoso sedante utilizado para bajar la presión sanguínea y tratar

las palpitaciones nerviosas; además calma la ansiedad, posee propiedades relajantes y calmantes y ayuda a conciliar el sueño en personas que sufren de insomnio. Se utiliza también para tratar estados gripales, y como descongestionante de los pulmones y la nariz. También facilitaría la digestión y actuaría como un diurético natural (Triska, 1975; Launert, 1981; Grieve, 1984; Lauriault, 1989; Bown, 1995; Jabeur *et al.*, 2017).

## OBJETIVOS

Considerando al nAChR y a la ACE como dos moléculas fundamentales en la señalización colinérgica y el déficit colinérgico progresivo que ocurre en la EA, el **OBJETIVO GENERAL** del capítulo III de la Tesis fue descubrir y optimizar compuestos bifuncionales potenciadores del nAChR e inhibidores de la ACE, partiendo de plantas de uso popular.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** fueron:

- Hallar un extracto con actividad potenciadora del nAChR e inhibidora de la ACE partiendo de seis extractos obtenidos a partir de hojas de plantas utilizadas en medicina popular por sus efectos a nivel de sistema nervioso central.
- A partir del o de los extractos activos, aislar e identificar la molécula responsable de dicha actividad bifuncional.
- Estudiar el mecanismo de acción de dicha molécula sobre el nAChR, caracterizando el tipo de activación y su sitio de acción.
- Optimizar la molécula estudiada mediante diseño racional por síntesis química.

# **CAPÍTULO III**

## **Parte I:**

### **Modulación de los nAChRs muscular y $\alpha 7$ neuronal e inhibición de la ACE por la cafeína**

## RESULTADOS

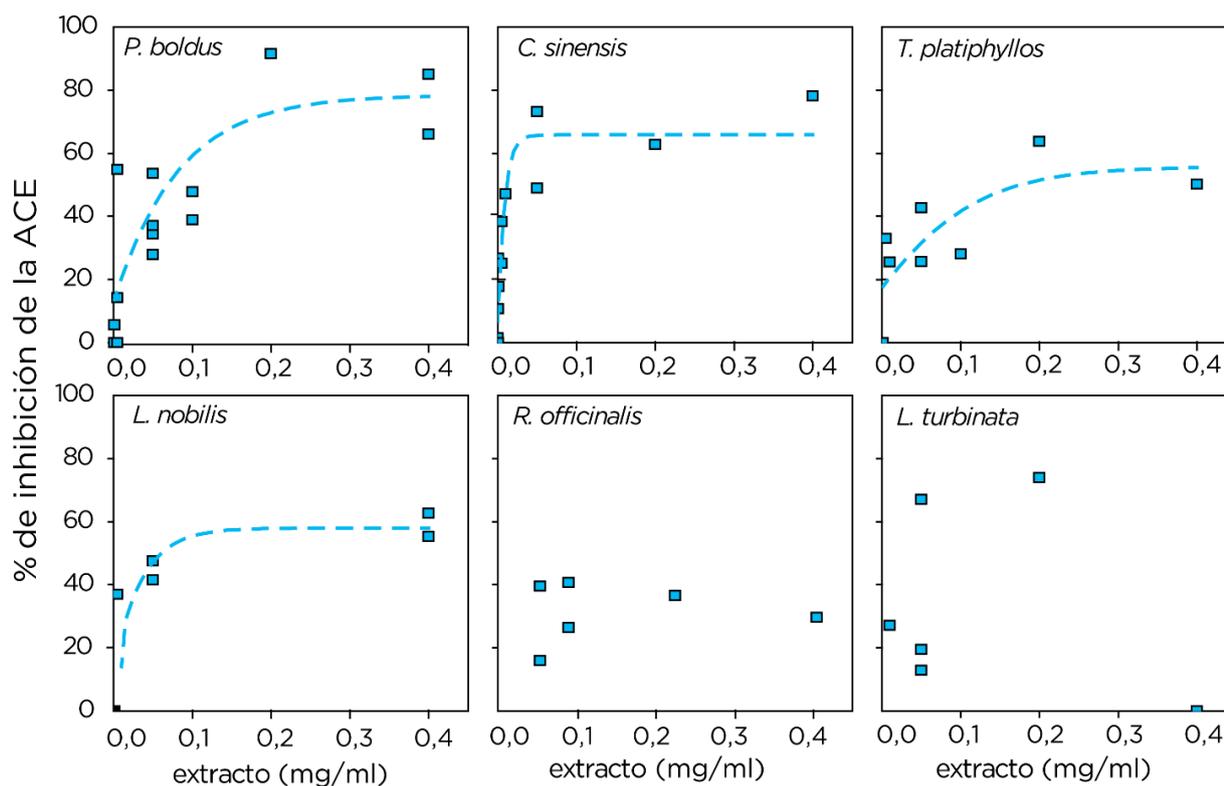
Basándonos en el conocimiento popular de los usos medicinales de las hojas de *P. boldus*, *L. nobilis*, *L. turbinata*, *R. officinalis*, *C. sinensis* (manufacturado como té rojo) y de *T. platiphyllus*, iniciamos la búsqueda de posibles nuevos principios activos en relación a dos blancos farmacológicos interesantes en el tratamiento de la EA como son: la ACE y los nAChRs. El objetivo fue encontrar compuestos activos bifuncionales, que actuaran sobre ambos blancos moleculares de manera conjunta.

En una primera instancia se obtuvo un extracto metanólico a partir de las hojas trituradas de cada una de las especies de plantas mencionadas (Figura 1).



**Figura 1.** Obtención de extractos metanólicos a partir de las hojas trituradas de las distintas especies de plantas utilizadas.

Como método de testeo se eligió evaluar la capacidad del extracto de inhibir la ACE mediante la reacción colorimétrica de Ellman (Ellman *et al.*, 1961). Como control de inhibición se utilizó galantamina comercial, un conocido inhibidor de la ACE que produjo una inhibición de la actividad de la enzima mayor al 90 %. Para los extractos metanólicos de las distintas plantas las concentraciones testeadas fueron entre 0 y 0,4 mg de extracto seco /ml, y diferentes resultados se obtuvieron con cada una de ellas (Figura 2).

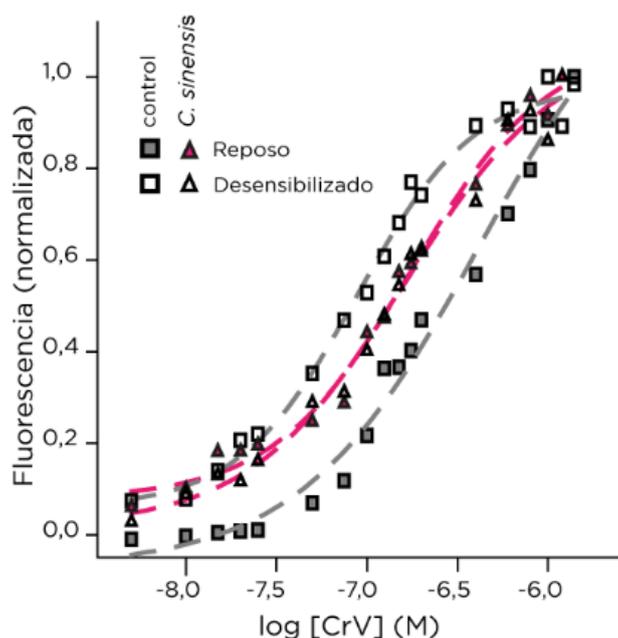


**Figura 2.** Porcentaje de inhibición de la ACE en función de la concentración de los extractos metanólicos de las distintas especies de plantas. La actividad de la ACE se midió a los 180 s de iniciada la reacción.

La Figura 2 muestra que cuatro de los seis extractos estudiados (boldo, té rojo, tilo y laurel) presentaron actividad anticolinesterásica, siendo los obtenidos a partir de hojas de boldo y de té rojo los de mayor poder inhibitorio ( $IC_{50}$  té rojo = 0,043 mg/ml e  $IC_{50}$  boldo = 0,089 mg/ml). Dado que el té rojo mostró una potencia de un orden de magnitud mayor se eligió este extracto para continuar los estudios. La inhibición de la actividad de la ACE fue dependiente de la concentración del extracto, con un valor de  $IC_{50}$  de 0,043 mg/ml (Figura 2), observándose una saturación a partir de valores cercanos a 0,1 mg/ml.

Luego de haber descripto el poder inhibitorio del extracto de *C. sinensis* sobre la ACE se evaluó la capacidad del mismo de inducir cambios conformacionales en el nAChR, el otro blanco molecular de interés. Para evaluar posibles cambios conformacionales del receptor en presencia del extracto metanólico de *C. sinensis*, utilizamos la sonda fluorescente CrV como en los dos capítulos anteriores de este trabajo de Tesis (Fernandez-Nievas *et al.*, 2008; Perillo *et al.*, 2012; Fabiani *et al.*, 2018). Esta sonda se ubica en el poro del canal iónico y tiene la ventaja de que permite identificar fácilmente distintos estados conformacionales del nAChR, ya que presenta para el nAChR de *T. californica* muy alta afinidad por el estado desensibilizado (en presencia de agonista) comparado con su

afinidad por el estado de reposo (en ausencia de agonista). Para la evaluación de la actividad del extracto de té rojo sobre el nAChR se utilizaron membranas de *T. californica* ricas en nAChR y se midió la fluorescencia del CrV. Los valores de la fluorescencia normalizados se graficaron en función de la concentración del CrV, obteniéndose de esa manera las curvas que se observan en la figura 3. Todas las condiciones experimentales fueron realizadas en ausencia y en presencia de carb, lo que en una situación control da información sobre el receptor en estado de reposo y en estado desensibilizado, respectivamente. En ausencia de carb y en presencia del extracto, se observó un corrimiento de la curva obtenida con respecto a la curva control sin extracto, lo que sugiere que el extracto de *C. sinensis* en una concentración de 0,1 mg/ml produce un cambio conformacional en el nAChR acercándolo a un estado desensibilizado (aún en ausencia de carb) (Figura 3). Cuando la misma condición se realizó en presencia de carb, la curva obtenida en presencia de extracto fue cercana a la obtenida en igual condición en situación control, es decir, el nAChR mantuvo la capacidad de alcanzar un estado desensibilizado en presencia del extracto. A partir de ambas curvas se calculó el valor de  $KD$  del CrV.



**Figura 3.** Curvas obtenidas luego de la titulación de membranas de ricas en nAChR *T. californica* con CrV. Las curvas grises corresponden a la situación control, las curvas rosas fueron obtenidas luego de la incubación de las membranas con el extracto metanólico de *C. sinensis* (0,1 mg/ml). Para cada situación se obtuvieron curvas en ausencia (símbolos coloreados) o presencia (símbolos sin color de relleno) de 1 mM de carb.

## 1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS DE *C. sinensis*

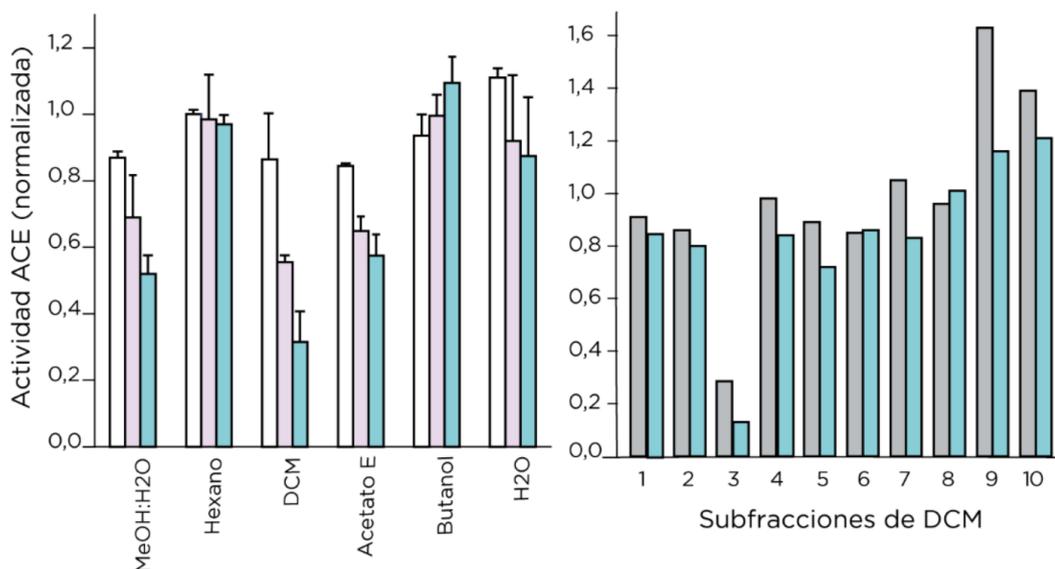
Para iniciar el aislamiento e identificación de los compuestos responsables de la actividad sobre la enzima ACE y sobre el nAChR muscular, se realizó un fraccionamiento bioguiado de un extracto de hojas de *C. sinensis* con una mezcla de metanol:agua (80:20) con solventes de polaridad creciente. Se obtuvieron de esta manera cinco fracciones: metanol (extracto inicial total), hexano, DCM, acetato de etilo y butanol (Figura 4).



**Figura 4.** Ampolla de decantación que muestra la separación de compuestos entre dos solventes de diferente polaridad. En este caso, se observa la partición del extracto metanólico (fase inferior) con el solvente acetato de etilo (fase superior).

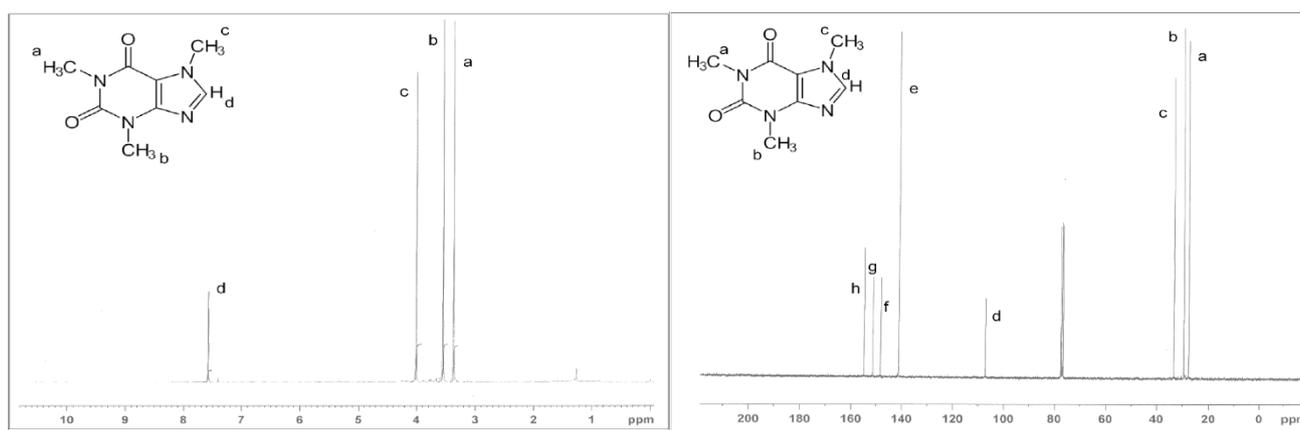
Tanto el extracto metanólico inicial como las distintas fracciones obtenidas fueron evaluados en su actividad, utilizando como método de testeo únicamente la capacidad de inhibición de la ACE, dada su mayor facilidad y rapidez. La fracción de DCM mostró el mayor poder inhibitorio (Figura 5 A).

A continuación, los componentes de la fracción de DCM se separaron mediante una columna de cromatografía utilizando como solvente eluyente DCM con concentraciones crecientes de metanol. Se obtuvieron 10 subfracciones, de las cuales solo la subfracción número 3 mostró actividad inhibidora de la ACE (Figura 5 B).



**Figura 5.** Actividad de la ACE en presencia de A) las diferentes fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *C. sinensis* (las columnas grises, rosas y celestes corresponden a 5, 20 y 40 µl de cada una de las fracciones aisladas, respectivamente) y B) las subfracciones obtenidas a partir de la fracción de DCM (las columnas rosas y celestes corresponden a 1 y 5 µl de cada una de las subfracciones aisladas, respectivamente). Cada columna representa la media ± D.S. de 3 experimentos independientes.

En la subfracción que resultó activa se evaluó la presencia de una o más moléculas mediante estudios de cromatografía en capa fina, que demostraron que dicha subfracción contenía una sola especie molecular. La identificación de esta especie se realizó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) identificándola como cafeína (Figura 6).

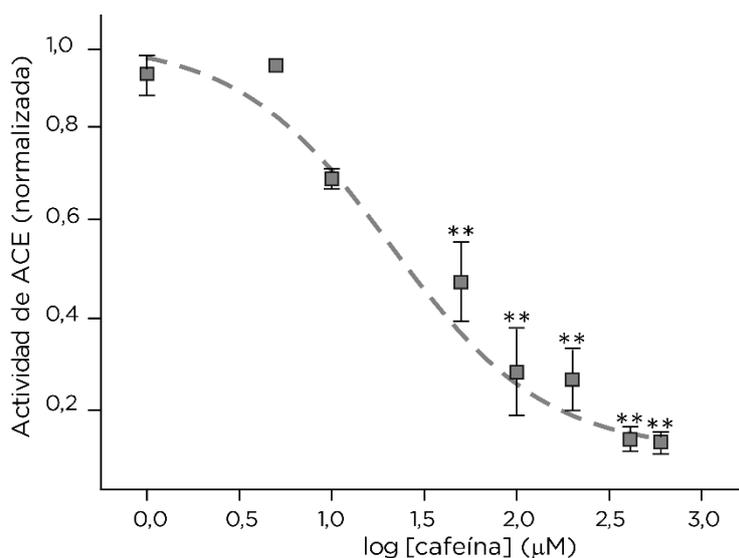


**Figura 6.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (izquierda) y <sup>13</sup>C (derecha) del compuesto activo obtenido de la subfracción 3. Se indican con distintas letras los diferentes hidrógenos (H) o carbonos (C) de las moléculas.

Para los experimentos que se realizaron luego se utilizó cafeína sintética para tener un control total de la identidad y pureza de la droga.

## 2. INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA POR LA CAFEÍNA

Para corroborar, luego de la identificación de la cafeína como el compuesto activo presente en el extracto de *C. sinensis*, que el efecto observado se debía a esta molécula, se procedió a cuantificar tanto la actividad de la ACE como los cambios conformacionales del nAChR en presencia de concentraciones crecientes de cafeína. Para la evaluación de la capacidad inhibitoria sobre la ACE, las concentraciones testeadas fueron 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400 y 600  $\mu\text{M}$  (Figura 7). Al igual que el extracto metanólico de *C. sinensis*, la cafeína produjo una inhibición de la ACE dependiente de concentración. El valor de  $\text{IC}_{50}$  obtenido luego del ajuste de la curva correspondiente fue 48,61  $\mu\text{M}$ .

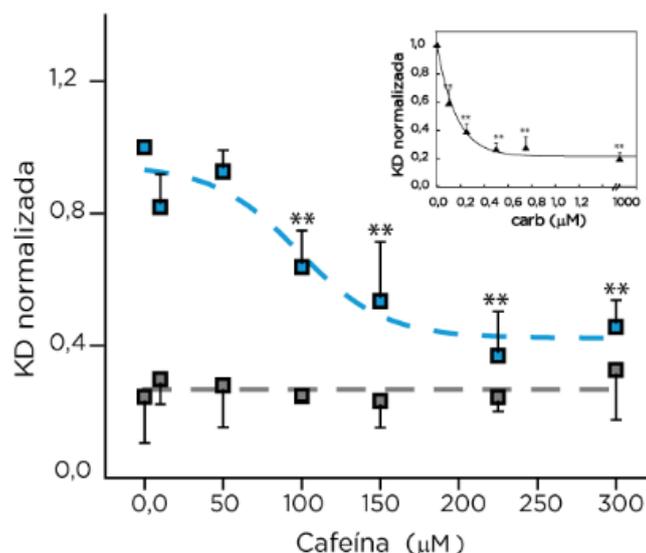


**Figura 7.** Curva de la acción inhibitoria de la cafeína sobre la ACE. Se expresa la actividad de la ACE en función del logaritmo de concentraciones crecientes de cafeína. La actividad de la ACE se midió a los 180 segundos de iniciada la reacción. Cada punto representa la media  $\pm$  D.S. de 3 experimentos independientes. “\*\*\*”=  $p < 0,001$ .

Para la evaluación de la actividad de la cafeína sobre el nAChR, membranas ricas en nAChR de *T. californica* fueron incubadas con concentraciones crecientes de cafeína (10-300  $\mu\text{M}$ ) en ausencia y presencia de carb. Luego de la incubación con cafeína, y en ausencia de carb, se observó una disminución del valor de  $KD$  del CrV, la cual fue dependiente de la concentración de cafeína agregada hasta una saturación del efecto con un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 98,1  $\mu\text{M}$  (Figura 8). Cuando el mismo experimento se realizó en presencia de carb, el

valor de  $KD$  del CrV se mantuvo constante en un valor cercano al obtenido con carb sola (Figura 8). Esto nos permitió decir que la cafeína induce cambios en la  $KD$  del CrV de manera saturante y dependiente de la concentración.

El mismo experimento fue realizado a modo de comparación utilizando concentraciones crecientes de carb, agonista total del nAChR, observándose también un decremento del valor de  $KD$  del CrV con una  $IC_{50}$  de  $0,12 \mu\text{M}$  (Figura 8, inserto).



**Figura 8.** Variaciones en los valores de  $KD$  del CrV en presencia de concentraciones crecientes de cafeína. Los valores fueron obtenidos a partir de membranas ricas en nAChR de *T. californica* en ausencia (■) o en presencia (■) de 1 mM de carb. Cada punto representa la media  $\pm$  D.S. de por lo menos 3 experimentos independientes. “\*\*\*”=  $p < 0,001$ . *Inserto:* variaciones de los valores de  $KD$  calculadas en presencia de concentraciones crecientes de carb.

Teniendo en cuenta estos resultados, los distintos efectos observados en presencia del extracto metanólico de *C. sinensis* fueron atribuidos al contenido de cafeína presente en los mismos. Si bien ya había sido reportado en trabajos anteriores la actividad inhibidora de la ACE que presenta la cafeína (Pohanka y Dobes, 2013), la actividad dual de la misma actuando también sobre el nAChR aún permanecía sin conocerse. Es por ello que se continuó la caracterización de su actividad sobre el nAChR.

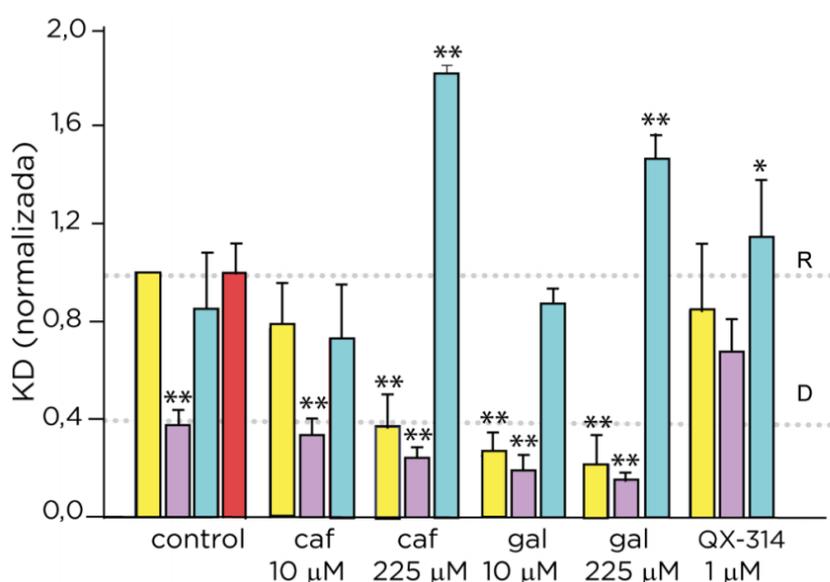
### 3. EFECTOS DE LA CAFEÍNA SOBRE LOS nAChRs MUSCULAR Y $\alpha 7$ NEURONAL

#### 3.1. CAMBIOS CONFORMACIONALES DEL nAChR MUSCULAR INDUCIDOS POR LA CAFEÍNA

Para profundizar en el conocimiento de la interacción cafeína-nAChR, se realizaron una serie de experimentos en los cuales las membranas ricas en nAChR de *T. californica* fueron preincubadas con 1  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -BTX, un antagonista competitivo específico del nAChR que bloquea los sitios de unión a ACh. Esto nos permitió dilucidar si la cafeína actúa sobre el nAChR en el mismo sitio que la ACh o bien si lo hace en un sitio alostérico. La presencia de  $\alpha$ -BTX por sí sola no produjo ningún cambio en los valores de *KD* del CrV en ausencia de carb, es decir, el nAChR en presencia del antagonista competitivo  $\alpha$ -BTX se mantuvo igual a una situación control en reposo (Figura 9). Dos concentraciones diferentes de cafeína (10 y 225  $\mu\text{M}$ ) fueron testeadas en presencia de  $\alpha$ -BTX (Figura 9). A 10  $\mu\text{M}$  la cafeína no produjo alteraciones de los valores de *KD* del CrV, es decir los valores obtenidos fueron similares a los obtenidos en ausencia de  $\alpha$ -BTX y de carb; similares a una situación de reposo. Por el contrario, a 225  $\mu\text{M}$  y en presencia de  $\alpha$ -BTX, se observó un gran aumento de los valores de *KD*, por encima de los valores obtenidos para una situación de reposo. Este incremento no había sido observado en ausencia de  $\alpha$ -BTX, donde fue evidente una reducción del valor de *KD* en presencia de cafeína y ausencia de carb, o un valor constante de *KD* en presencia de carb. Debido a esto, nos planteamos si la cafeína a altas concentraciones podría estar bloqueando al nAChR desde un sitio distinto al que lo hace la  $\alpha$ -BTX.

Experimentos similares fueron llevados a cabo con galantamina (10 y 225  $\mu\text{M}$ ) (Figura 9), un agonista parcial del nAChR e inhibidor comercial de la ACE (Grossberg, 2003; Nordberg y Svensson, 1998). Una clara disminución de los valores de *KD* se pudo observar a ambas concentraciones de galantamina en ausencia de carb, de manera similar a lo observado con cafeína. Cuando las membranas fueron preincubadas con  $\alpha$ -BTX, la presencia de 10  $\mu\text{M}$  de galantamina resultó en valores de *KD* del CrV cercanos a los valores obtenidos para un estado de reposo y a los obtenidos con la misma concentración de cafeína. Sin embargo, con 225  $\mu\text{M}$  de galantamina, se repitió el comportamiento observado con altas concentraciones de cafeína: el valor de *KD* aumentó significativamente. Trabajos previos (Akk y Steinbach, 2005) reportaron a la galantamina como un agonista parcial y bloqueador de canal abierto del nAChR, es decir produce un bloqueo diferente al generado por la  $\alpha$ -BTX.

Por último, se realizó el mismo experimento pero en presencia ahora de 1  $\mu\text{M}$  de QX-314 (Figura 9), un bloqueador de canal abierto del nAChR (Pascual y Karlin, 1998; Yu *et al.*, 2003). Cuando las membranas fueron incubadas en presencia de QX-314 y en ausencia de carb, no se produjeron cambios significativos en los valores de *KD*. En presencia de carb, en cambio, el valor de *KD* fue similar al obtenido en estado de reposo, lo que sugiere que este bloqueador de canal abierto impide que el nAChR se desplace hacia una conformación desensibilizada incluso en presencia de carb. Finalmente, cuando las membranas fueron preincubadas con  $\alpha$ -BTX, el agregado de QX-314 produjo un aumento de los valores de *KD* con respecto a los valores obtenidos para el estado R. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con cafeína y galantamina.



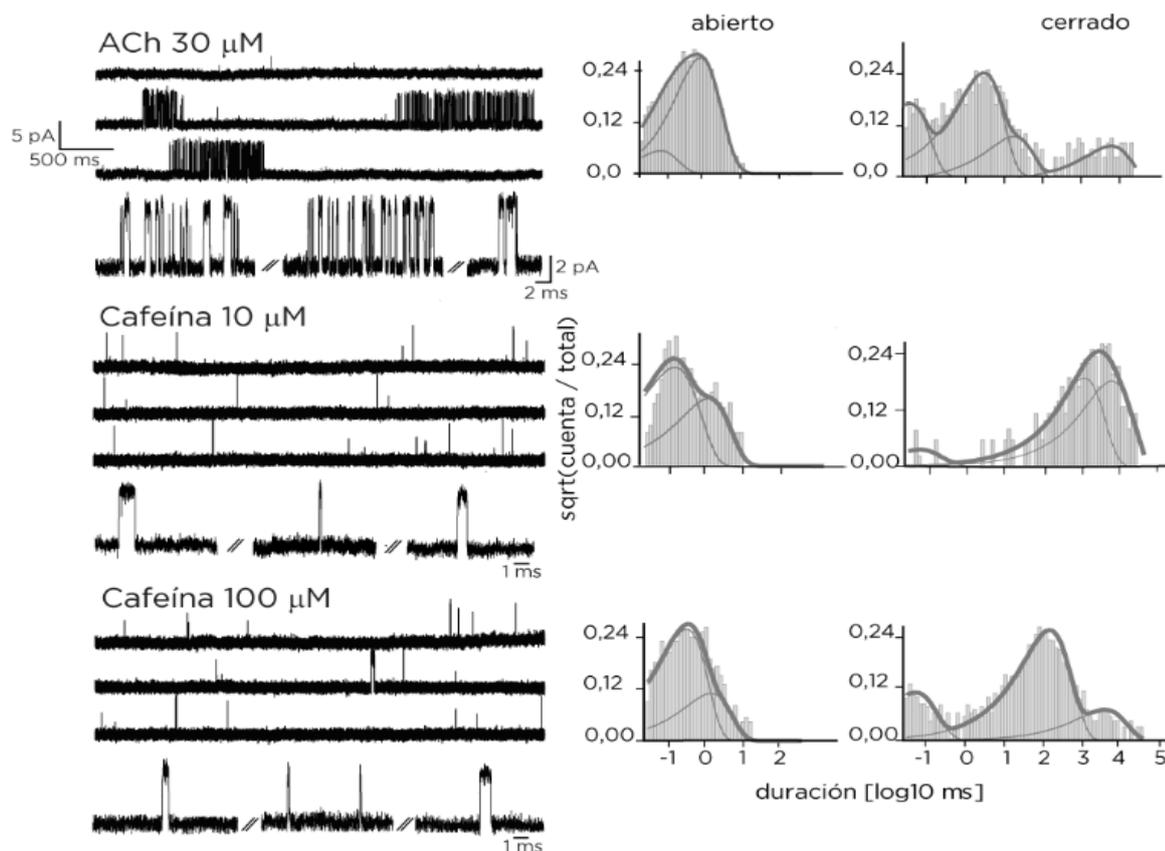
**Figura 9.** Variaciones en los valores de *KD* del CrV en las distintas condiciones estudiadas con respecto a la situación control. Las columnas amarillas corresponden a los valores obtenidos para el nAChR en estado de reposo; las columnas rosas corresponden a los valores obtenidos en presencia de 1 mM de carb (más la droga correspondiente); las columnas celestes corresponden a los valores obtenidos luego de la preincubación con  $\alpha$ -BTX (más la droga correspondiente); y la columna azul corresponde a los valores obtenidos luego de la incubación con carb y  $\alpha$ -BTX. Cada columna representa la media  $\pm$  D.S. de por lo menos 3 experimentos independientes. “\*” =  $p < 0,05$  y “\*\*” =  $p < 0,001$ .

Los resultados obtenidos nos permitieron postular que la cafeína se comporta frente al nAChR como un agonista y, además, en altas concentraciones, como un bloqueador de canal abierto.

### 3.2. MODULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS nAChRs POR LA CAFEÍNA

Para entender el mecanismo molecular subyacente a los cambios conformacionales observados en el nAChR mediante técnicas de fluorescencia, se estudió mediante la técnica de *patch-clamp* si la cafeína es capaz de activar tanto al nAChR muscular como al  $\alpha 7$  neuronal. En una primera instancia se expresó el nAChR muscular de ratón en células BOSC 23, y se realizaron experimentos en la configuración *cell-attached* con 30  $\mu\text{M}$  de ACh (agonista natural del nAChR) como un control de expresión. En los registros obtenidos se observaron eventos de  $5,2 \pm 0,6$  pA (a  $-70\text{mV}$  de potencial de membrana) agrupados en *clusters* de  $140 \pm 70$  ms con una probabilidad de apertura de  $0,4 \pm 0,1$ . A esta concentración de ACh los histogramas de estado abierto se describen con 1 o 2 componentes siendo siempre la duración del componente mayoritario de alrededor de 1 ms (Bouzat *et al.*, 2000; Corradi *et al.*, 2007). Los histogramas de estado cerrado fueron descritos con 3 o 4 componentes, de los cuales los 2 más breves corresponden a los cierres dentro de los *clusters* (Corradi *et al.*, 2007) (Figura 10).

Para observar lo que ocurría en presencia de cafeína (y en ausencia de ACh) se realizaron registros con 1, 10, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$  de cafeína. A concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  de cafeína no se observaron canales en un total de 11 sellos, a diferencia de lo que ha sido reportado para la misma concentración de ACh, donde se detectan eventos aislados (Bouzat *et al.*, 2000). Concentraciones mayores de cafeína (10, 50, y 100  $\mu\text{M}$ ) produjeron la activación del receptor en forma de eventos aislados. Si bien la frecuencia de canales aumentó con la concentración de cafeína, el perfil de activación se mantuvo constante y en ningún caso se detectaron *clusters*. Estos resultados indican que la cafeína actúa como un agonista parcial del nAChR muscular (Figura 10). Los histogramas de estado abierto obtenidos a partir del análisis de los registros en presencia de cafeína se describen con uno o dos componentes, cuyas duraciones fueron semejantes a las observadas con ACh (Figura 10, Tabla 1). Sin embargo, las áreas relativas de cada componente de apertura generadas por cafeína fueron diferentes a las obtenidas con ACh, ya que ambos componentes mostraron una frecuencia similar de aparición de alrededor de 0,5 (Figura 10, Tabla 1).



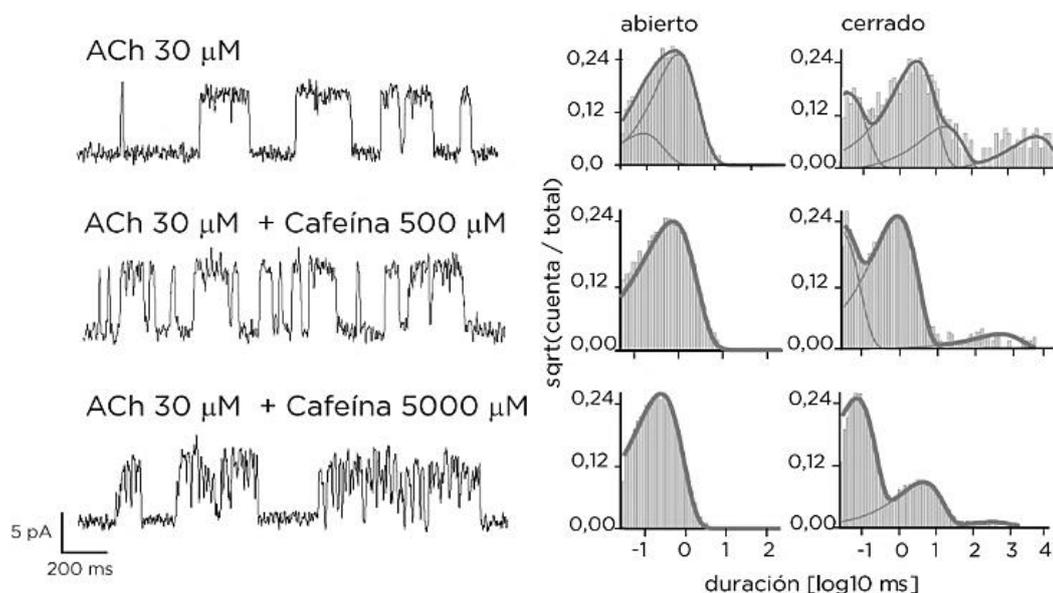
**Figura 10.** Registros de canal único del nAChR muscular en las distintas condiciones, a baja (arriba) y alta (abajo) resolución. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

Agonista	[ $\mu$ M]	Amp (pA)	O1 (ms) (área)	O2 (ms) (área)	C1 (ms) (área)	C2 (ms) (área)
ACh	30	$5,2 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,3$ ( $0,95 \pm 0,09$ )	$0,3 \pm 0,2$ ( $0,15 \pm 0,10$ )	$0,06 \pm 0,04$ ( $0,11 \pm 0,05$ )	$2,8 \pm 0,9$ ( $0,82 \pm 0,07$ )
Cafeína	10	$5,9 \pm 0,1$	$0,97 \pm 0,19$ ( $0,43 \pm 0,23$ )	$0,13 \pm 0,04$ ( $0,63 \pm 0,26$ )	$0,04 \pm 0,03$ ( $0,02 \pm 0,01$ )	--
	50	$5,4 \pm 0,3$	$0,90 \pm 0,23$ ( $0,51 \pm 0,21$ )	$0,19 \pm 0,08$ ( $0,49 \pm 0,21$ )	$0,04 \pm 0,02$ ( $0,05 \pm 0,02$ )	--
	100	$5,8 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,2$ ( $0,47 \pm 0,19$ )	$0,22 \pm 0,08$ ( $0,52 \pm 0,19$ )	$0,03 \pm 0,01$ ( $0,05 \pm 0,02$ )	--

**Tabla 1.** Características a nivel de canal único de la activación del nAChR muscular por ACh o cafeína. “O1” y “O2” corresponden a las duraciones del estado abierto y “C1” y “C2” corresponden a las duraciones de estado cerrado, obtenidos de registros activados por ACh ( $30 \mu$ M) o Cafeína ( $10, 50$  y  $100 \mu$ M).

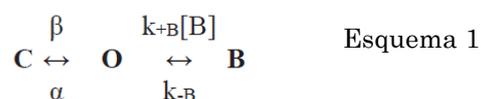
Para explicar cómo la cafeína modula la respuesta del nAChR muscular a ACh, se realizaron registros de canal único a  $30 \mu$ M de ACh en presencia de concentraciones crecientes de cafeína ( $0 - 20$  mM). A partir del análisis de los registros se observó una clara

reducción del tiempo de estado abierto, así como un aumento de la duración de los *clusters* en función de la concentración de cafeína. Los eventos obtenidos a 30  $\mu\text{M}$  de ACh en presencia de 500 o 5000  $\mu\text{M}$  de cafeína mostraron una duración de estado abierto de  $0,61 \pm 0,09$  ms y  $0,23 \pm 0,02$  ms y una duración media de *cluster* de  $230 \pm 80$  ms y  $450 \pm 260$  ms, respectivamente (Figura 11).



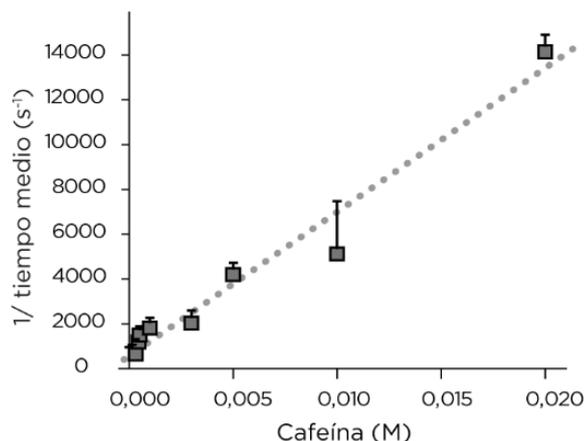
**Figura 11.** Registros de canal único del nAChR muscular en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de ACh + 500 o 5000  $\mu\text{M}$  de cafeína. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

Estas observaciones son consistentes con lo que se espera para un bloqueador de canal abierto, que puede ser representado por el esquema clásico de bloqueo propuesto por Neher y Steinbach (1978):



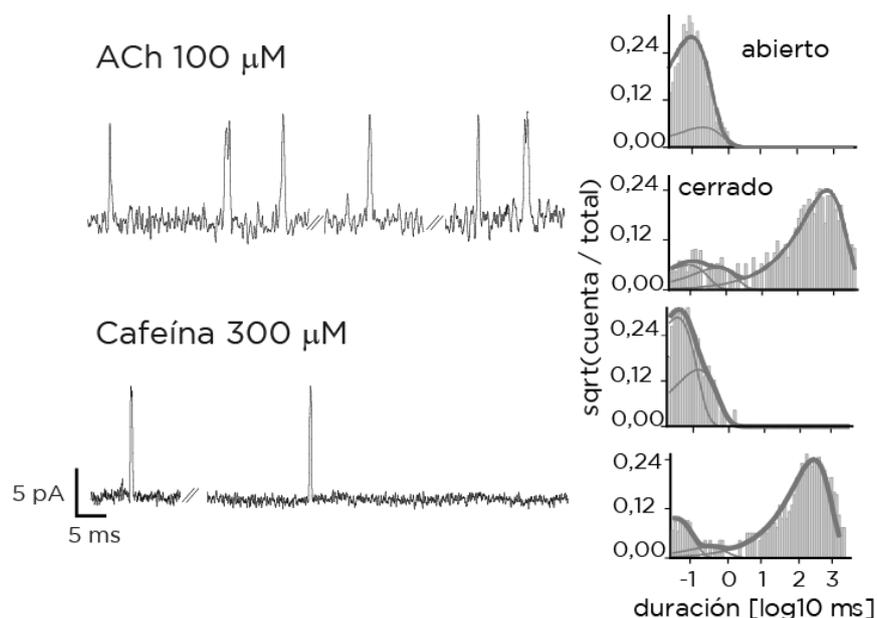
donde C, O y B corresponden a los estados cerrado, abierto y bloqueado, respectivamente. Graficando la inversa de la duración del componente abierto de mayor duración en función de la concentración de cafeína se observa una relación lineal. La pendiente de la recta de regresión lineal permite obtener la constante de bloqueo ( $k_{+B}$ ), que en este caso fue de  $6,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $r^2 = 0,98$ ). El hecho de que el área del componente

cerrado más breve aumente cuando aumenta la concentración de cafeína ( $0,11 \pm 0,04$  y  $0,77 \pm 0,04$  a 0 y  $5000 \mu\text{M}$  de cafeína, respectivamente) junto con la disminución de la duración de la apertura más larga, se puede asociar a un proceso de bloqueo rápido. De esta manera, la inversa del componente cerrado más breve fue usada como una estimación de la constante de desbloqueo ( $k_{-B}$ ), cuyo valor fue  $25000 \text{ s}^{-1}$ . Nuestros resultados confirman que la cafeína es capaz de bloquear al nAChR con una constante de bloqueo estimada en ( $K_B = k_{-B}/k_{+B}$ )  $35 \text{ mM}$  (Figura 12).



**Figura 12.** Relación entre la inversa de la duración del componente de estado abierto más largo y la concentración de cafeína. Los datos fueron ajustados en base al esquema 1, donde  $1/\tau O1 = \alpha + k_{+B} [\text{caf}]$ .  $\tau O1$  es la duración de la apertura más larga,  $k_{+B}$  la constante de bloqueo y  $\alpha$  la constante de cierre. Cada punto representa la media  $\pm$  D.S. de 3 experimentos independientes.

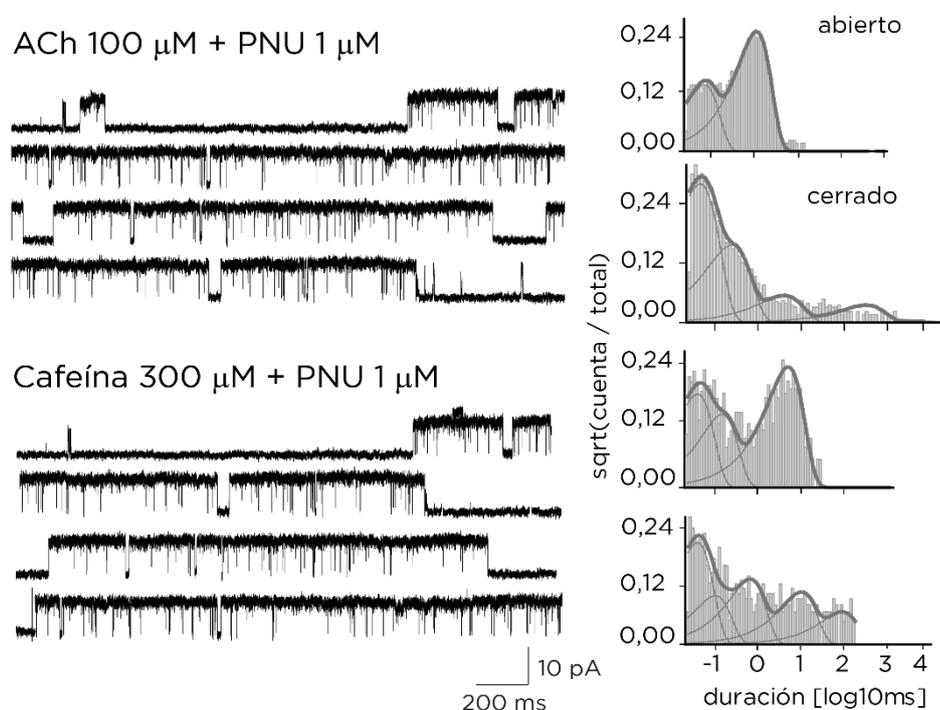
Para comprender mejor la selectividad de la cafeína, se exploró luego su capacidad de activar al nAChR  $\alpha 7$  neuronal. Con este fin, se realizaron experimentos de canal único a diferentes concentraciones de cafeína ( $100$  y  $300 \mu\text{M}$ ) en células BOSC 23 expresando el nAChR  $\alpha 7$ . Como control de expresión utilizamos ACh en una concentración de  $100 \mu\text{M}$ , a la cual se detectaron eventos de alrededor de  $10 \text{ pA}$  (a  $-70 \text{ mV}$  de potencial de membrana) en forma de aperturas aisladas, similar a lo reportado previamente (Bouzat *et al.*, 2008). Con  $100 \mu\text{M}$  de cafeína, en cambio, no se detectaron eventos, pero sí fueron detectados eventos breves cuando la concentración se aumentó a  $300 \mu\text{M}$  de cafeína, sugiriendo esto que la cafeína estaría actuando como un agonista débil sobre el nAChR  $\alpha 7$  (Figura 13).



**Figura 13.** Trazos representativos de registros de canal único del nAChR  $\alpha 7$  en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de ACh y 300  $\mu\text{M}$  de cafeína. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

Dado que la activación del receptor  $\alpha 7$  por ACh ocurre en forma de eventos de muy baja frecuencia, y considerando que la cafeína podría actuar como un agonista de baja eficacia, se realizaron luego experimentos en presencia de PNU, modulador alostérico positivo de este receptor. En presencia de 100  $\mu\text{M}$  de ACh y 1  $\mu\text{M}$  de PNU, los eventos aparecen con más frecuencia y en forma de *clusters* de alta probabilidad de apertura ( $0,92 \pm 0,02$ ) y larga duración ( $3100 \pm 1700$  ms). Los histogramas de estado abierto mostraron 2 o 3 componentes, y se observó un claro incremento en las duraciones de los mismos con respecto a los obtenidos en ausencia de PNU, debido a la potenciación del nAChR  $\alpha 7$  neuronal. Los histogramas de estado cerrado mostraron 4 o 5 componentes, de los cuales los 3 más breves son considerados cierres dentro del *cluster*. El tiempo crítico para definir un *cluster* fue obtenido por la intersección entre el tercer y cuarto componente del histograma de estados cerrados. Todos los resultados obtenidos de la activación del receptor  $\alpha 7$  con ACh en presencia de PNU fueron similares a los reportados previamente (daCosta y Baenziger, 2011). Para confirmar que la cafeína actúa como un agonista del nAChR  $\alpha 7$ , se obtuvieron registros de canal único a concentraciones crecientes de cafeína (1, 10, 50 y 300  $\mu\text{M}$ ) en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de PNU. Eventos de canal único fueron detectados a todas las concentraciones de cafeína testeadas, y el patrón de activación fue similar a lo observado con ACh y en presencia de PNU ( $3800 \pm 1600$  ms y  $3200 \pm 80$  ms la duración del *cluster*, y  $0,97 \pm 0,02$  y  $0,96 \pm 0,01$  para la probabilidad de apertura a 1 y 300

$\mu\text{M}$  de cafeína, respectivamente). Los histogramas de estado abierto y cerrado fueron también similares a los obtenidos a partir de los registros de activación con ACh, observándose 2 o 3 componentes en los histogramas de estado abierto y 4 o 5 componentes en los histogramas de estado cerrado (Figura 14).



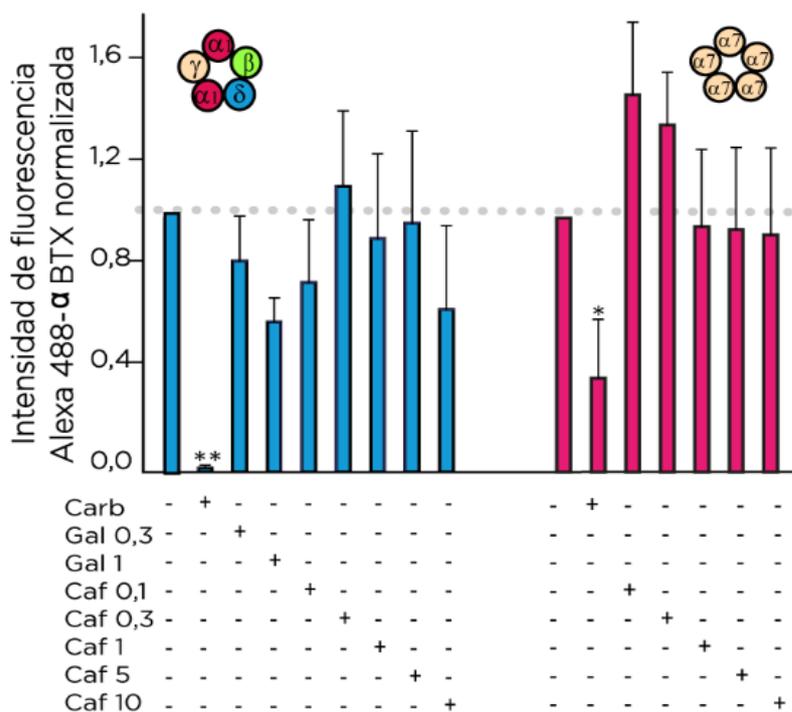
**Figura 14.** Registros de canal único del nAChR  $\alpha 7$  en presencia de  $100 \mu\text{M}$  de ACh +  $1 \mu\text{M}$  de PNU y  $300 \mu\text{M}$  de cafeína +  $1 \mu\text{M}$  de PNU. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70 \text{ mV}$  de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

En base a los resultados de activación y modulación del receptor muscular y del receptor neuronal  $\alpha 7$ , se pudo concluir que la cafeína actúa como agonista de ambos receptores a bajas concentraciones y, además, como un bloqueador del nAChR muscular a concentraciones altas.

#### 4. SITIOS DE UNIÓN DE LA CAFEÍNA A LOS nAChRs MUSCULAR Y $\alpha 7$ NEURONAL

Dados los resultados obtenidos, los cuales mostraron que la cafeína produce cambios conformacionales en el nAChR muscular y que, además, es capaz de activar los nAChRs muscular y  $\alpha 7$  neuronal, nos propusimos estudiar sus sitios de unión a estos receptores.

Para esto se realizaron experimentos con  $\alpha$ -BTX fluorescente utilizando membranas ricas en nAChR de *T. californica* o células BOSC 23 expresando el nAChR  $\alpha 7$  neuronal. Tanto las membranas como las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de cafeína, seguido de la adición de Alexa 488- $\alpha$ BTX. La  $\alpha$ -BTX se une irreversible y competitivamente a los nAChRs. Al estar conjugada con la sonda fluorescente Alexa-488, es posible detectar los cambios de fluorescencia de la misma y correlacionarlos al comportamiento de la  $\alpha$ -BTX sobre el nAChR. Resultados similares fueron obtenidos ya sea trabajando con membranas ricas en nAChR o con células que expresan el nAChR. En presencia de 1 mM de carb, la intensidad de fluorescencia de Alexa 488- $\alpha$ BTX fue más baja que la obtenida en la condición control, diferencia estadísticamente significativa, confirmando así un desplazamiento de la  $\alpha$ -BTX de sus sitios en el receptor por carb (Figura 15). Sin embargo, a las diferentes concentraciones de cafeína testeadas, la intensidad de fluorescencia fue similar a la obtenida para la condición control, sugiriendo que la cafeína no afecta la unión de la  $\alpha$ -BTX al nAChR (Figura 15). Resultados similares fueron observados cuando los experimentos fueron realizados en presencia de galantamina, un activador alostérico del nAChR (Figura 15).



**Figura 15.** Intensidad de fluorescencia de Alexa 488- $\alpha$ BTX normalizada detectada por su unión a nAChR muscular de *T. californica* (■) o nAChR  $\alpha 7$  (■) en las distintas condiciones testeadas. Todos los valores corresponden a concentraciones mM. Cada barra representa la media  $\pm$  D.S. de 3 experimentos independientes. “\*”=  $p < 0,05$  y “\*\*”=  $p < 0,001$ .

Estos resultados permitieron postular que la cafeína se comporta como un agonista alostérico, o bien un agonista ortósterico de muy baja afinidad, de los nAChRs muscular y nAChR  $\alpha 7$  neuronal.

# **CAPÍTULO III**

## **Parte II:**

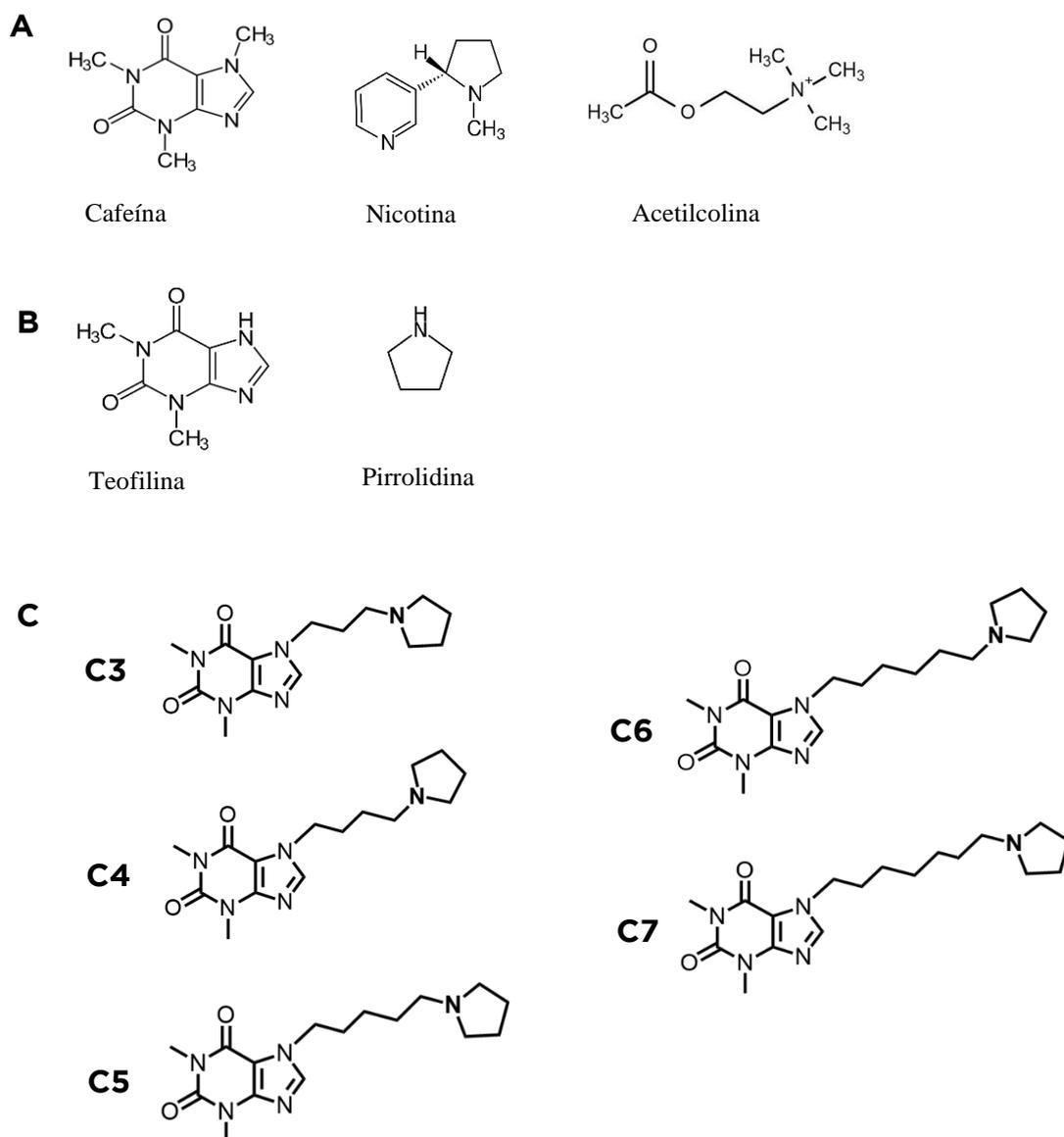
### **Modulación del nAChR muscular e inhibición de la ACE por derivados sintéticos de la cafeína**

## RESULTADOS

Habiendo caracterizado la actividad de la molécula de cafeína en el nAChR, en la segunda parte de este capítulo nos propusimos obtener análogos sintéticos de esta molécula con la finalidad de potenciar su actividad biológica.

La IUPAC define un farmacóforo como "un conjunto de rasgos estéricos y electrónicos necesarios para asegurar las óptimas interacciones supramoleculares con un blanco biológico específico y desencadenar (o bloquear) su respuesta biológica". El primer modelo de farmacóforo nicotínico se formuló en 1970, cuando Beers y Reich postularon que los ligandos nicotínicos forman un puente de hidrógeno con el receptor debido a que poseen un átomo aceptor de puente de hidrógeno (nitrógeno en la nicotina y oxígeno en la ACh), además de un centro cargado positivamente (Beers y Reich, 1970). Este modelo clásico ha servido de punto de partida para el desarrollo de otros modelos, y, mientras que algunos detalles aún continúan debatiéndose, a lo largo de los años ha quedado demostrado que existen dos características determinantes para los ligandos de los nAChRs: la presencia de un centro catiónico con un átomo electronegativo, que establece una interacción catión- $\pi$  con un triptófano conservado en la estructura de los nAChRs, y un aceptor de un enlace de hidrógeno (Blum *et al.*, 2010).

Teniendo esto en cuenta, para el diseño de los análogos sintéticos de la cafeína se tomó como punto de partida la molécula de teofilina, cuya única diferencia con la cafeína es la ausencia de un grupo metilo en posición 7 (Figura 16 B). En dicha posición se conectó esta molécula, por medio de una cadena hidrocarbonada, con un grupo pirrol (estructura presente en la molécula de nicotina), pirrolidina (Figura 16 B). Esta incorporación tuvo el objetivo de hacer más específica la molécula para los nAChRs. Se obtuvieron así cinco análogos que difirieron en el largo de la cadena hidrocarbonada (desde 3 hasta 7 átomos de carbono, compuestos en adelante denominados C3 a C7) (Figura 16 C).



**Figura 16.** Estructura química de A) cafeína, nicotina y ACh, B) compuestos base para la síntesis de los análogos: teofilina y pirrolidina y C) análogos de la cafeína obtenidos.

## 1. INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA POR LOS ANÁLOGOS DE LA CAFEÍNA

Inicialmente se evaluó que los compuestos obtenidos mantuvieran la actividad de inhibición de la ACE descrita para la cafeína. Dicha actividad fue evaluada *in vitro* mediante el método espectrofotométrico de Ellman. Los valores de IC<sub>50</sub> para la inhibición de la ACE se resumen en la tabla 2.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	log IC <sub>50</sub> ± D.S.
<b>Cafeína</b>	48,61	1,680 ± 0,058
<b>Teofilina</b>	473,01	2,675 ± 0,0787
<b>Pirrolidina</b>	ND	ND
<b>C3</b>	56,22	1,750 ± 0,031
<b>C4</b>	21,75	1,337 ± 0,044
<b>C5</b>	13,50	1,130 ± 0,025
<b>C6</b>	6,09	0,784 ± 0,044
<b>C7</b>	0,22	-0,657 ± 0,015
<b>Tacrina</b>	0,029	-1,532 ± 0,051

**Tabla 2.** Actividad de la ACE en presencia de los distintos compuestos testeados. ND: no detectada.

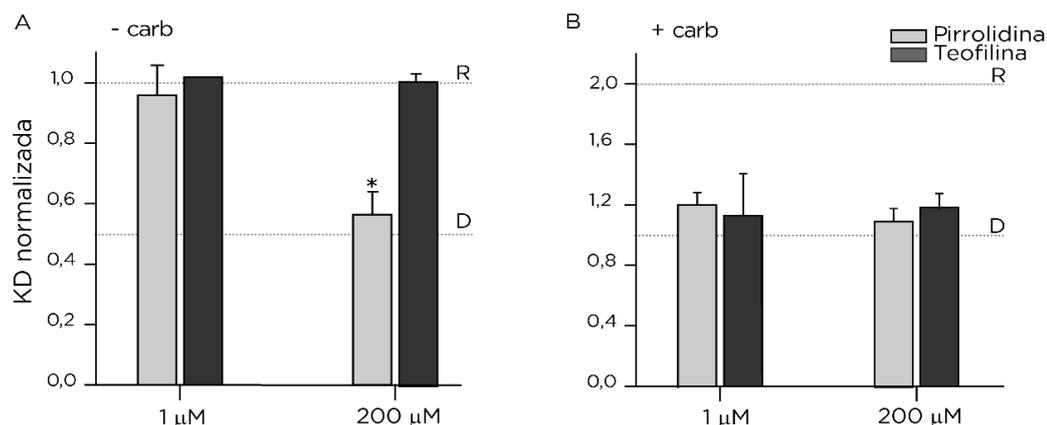
Los derivados sintéticos de la cafeína presentaron mayor potencia inhibitoria sobre la actividad de la ACE con respecto a sus precursores, la teofilina y la pirrolidina, y la mayoría de ellos también con respecto a la cafeína. Dicho aumento en la potencia de los compuestos fue directamente proporcional a la longitud de la cadena carbonada entre la teofilina y la pirrolidina. El compuesto C7, con una cadena espaciadora de siete carbonos mostró la inhibición más potente con un valor de IC<sub>50</sub> de 0,22 μM.

## 2. EFECTO DE LOS ANÁLOGOS DE LA CAFEÍNA SOBRE EL nAChR MUSCULAR

### 2.1. CAMBIOS CONFORMACIONALES DEL nAChR MUSCULAR INDUCIDOS POR LOS ANÁLOGOS DE LA CAFEÍNA

Para explorar si, además de la capacidad de inhibir la actividad de la ACE, los distintos análogos de cafeína testeados tenían un efecto directo sobre el nAChR, recurrimos nuevamente a evaluar posibles cambios conformacionales del nAChR

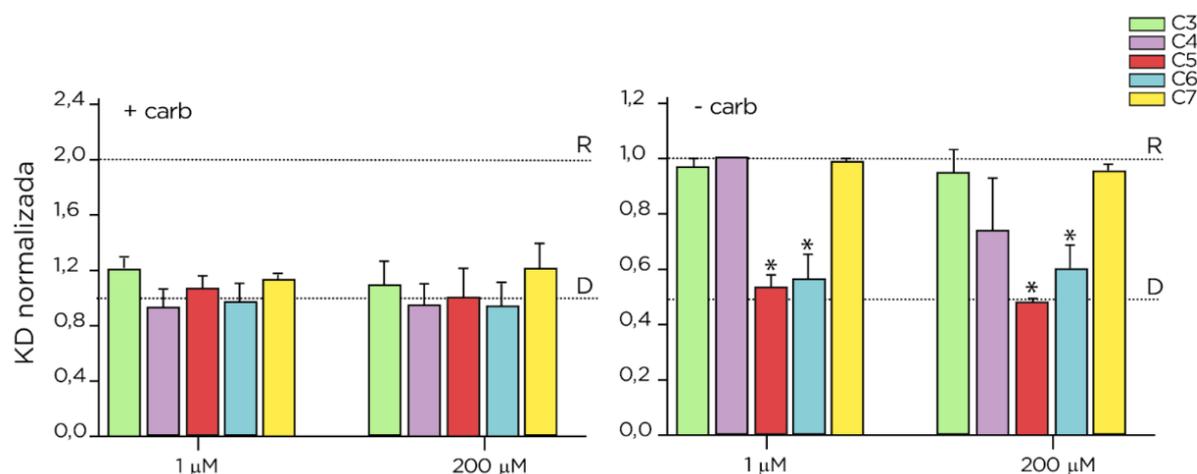
inducidos por la presencia de C3-C7. En primer lugar, se incubaron las membranas de *T. californica* con los sustratos teofilina y pirrolidina, en ausencia y en presencia de carb. La teofilina no produjo cambios en el estado conformacional del nAChR en ninguna de las dos concentraciones estudiadas (Figura 17 A y B). Por el contrario, la pirrolidina indujo cambios en los valores de *KD* del CrV. Los valores de *KD* obtenidos en ausencia de carb fueron cercanos a los obtenidos para el nAChR en estado desensibilizado, lo que sugiere que la pirrolidina llevó a la desensibilización del nAChR (Figura 17 A y B).



**Figura 17.** Variaciones en los valores de *KD* del CrV obtenidas luego de la incubación con distintas concentraciones de pirrolidina y teofilina. A) Condición en ausencia de carb: las variaciones son calculadas con respecto a la situación control en reposo, recta “R”. B) Condición en presencia de carb: las variaciones son calculadas con respecto a la situación control desensibilizada, recta “D”. Cada columna representa la media  $\pm$  D.S. de por lo menos 3 experimentos independientes. “\*” =  $p < 0,05$ .

Para estudiar el efecto de los análogos sintéticos de la cafeína sobre el nAChR, se incubaron las membranas ricas en nAChR de *T. californica* con concentraciones crecientes (0,01 pM - 400 μM) de C3, C4, C5, C6 y C7 tanto en ausencia como en presencia de carb. Independientemente del compuesto con el que se hayan incubado las membranas, en presencia de carb los valores de *KD* del CrV obtenidos fueron similares a la situación control (presencia de carb y ausencia de los análogos) (Figura 18 B). Es decir, cuando se agregó carb se observó, en presencia de todos los análogos, la desensibilización del nAChR. En ausencia de carb, por el contrario, diferentes resultados fueron obtenidos con los diferentes análogos. Cuando las membranas de *T. californica* se incubaron con distintas concentraciones de C3 o de C7, prácticamente no se observaron cambios. En estas condiciones los valores de *KD* se mantuvieron similares a los obtenidos para el nAChR en estado de reposo (Figura 18 A). En cambio, cuando las membranas se incubaron con los análogos C4, C5 o C6 se observaron cambios en los valores de *KD*. Con C4 fueron

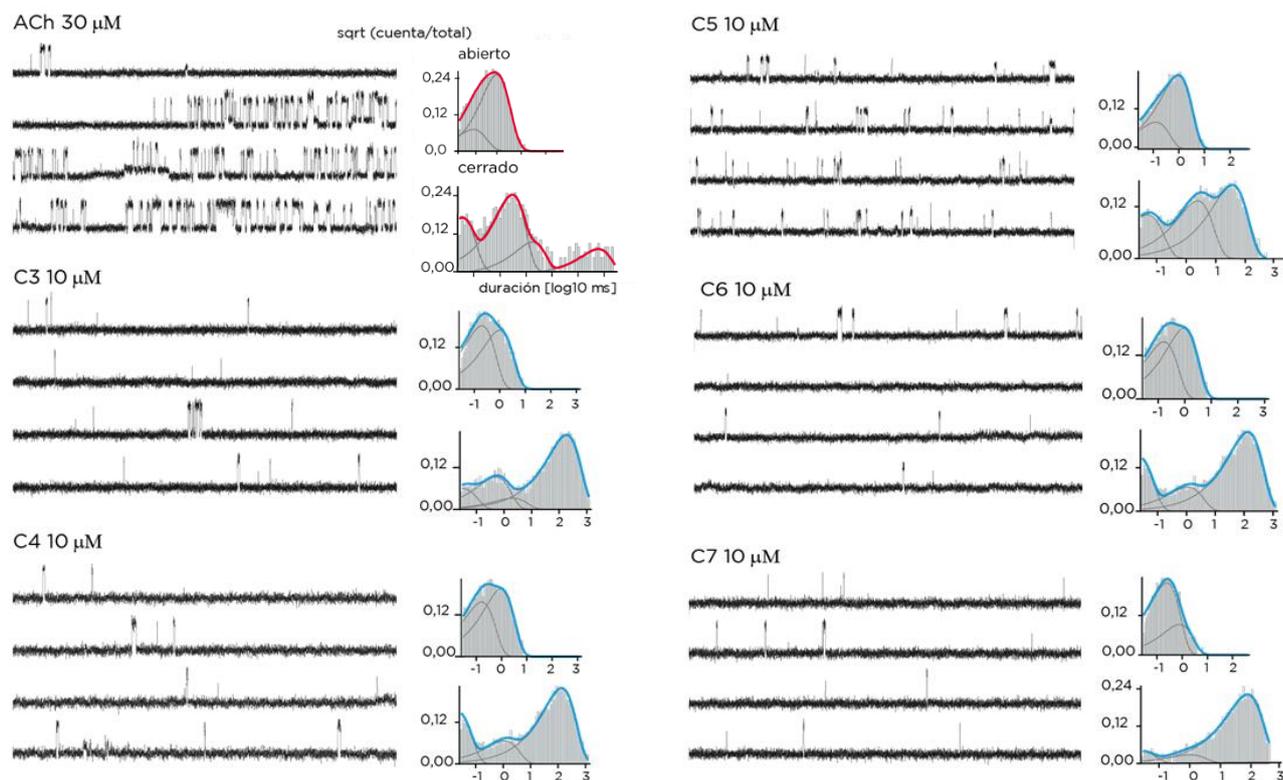
necesarias altas concentraciones del compuesto (200-400  $\mu\text{M}$ ) para que los valores de  $KD$  obtenidos fueran cercanos a los obtenidos para el nAChR en estado desensibilizado (Figura 18 A). Cuando se trabajó con los compuestos C5 y C6, en cambio, los valores de  $KD$  del CrV fueron prácticamente iguales a los obtenidos en presencia de carb en todo el rango de concentraciones estudiadas, sugiriendo esto que C5 y C6, aun en muy bajas concentraciones, son capaces de llevar al receptor a un estado desensibilizado (Figura 18 A).



**Figura 18.** Variaciones en los valores de  $KD$  del CrV obtenidas luego de la incubación con distintas concentraciones de los análogos de cafeína. A) Condición en ausencia de carb: las variaciones son calculadas con respecto a la situación control en reposo, recta “R”. B) Condición en presencia de carb: las variaciones son calculadas con respecto a la situación control desensibilizada, recta “D”. Cada columna representa la media  $\pm$  D.S. de 2 o 3 experimentos independientes. “\*”=  $p < 0,05$ .

## 2.2. MODULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS nAChRs POR LOS ANÁLOGOS DE LA CAFEÍNA

Nos propusimos luego estudiar la funcionalidad de los nAChRs en presencia de los análogos sintéticos de cafeína. Para un primer estudio se realizaron registros de canal único en configuración *cell-attached* en presencia de los compuestos C3, C4, C5, C6 o C7 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y en ausencia de ACh. Como control de expresión se utilizó nuevamente ACh 30  $\mu\text{M}$ , obteniéndose los registros típicos ya descritos. Los registros obtenidos a partir de los análogos sintéticos de cafeína mostraron eventos de aperturas de aproximadamente 5 pA, lo que indica que son capaces de actuar como agonistas del nAChR muscular. Las aperturas se observaron en general como eventos aislados para todos los compuestos testeados (Figura 19).



**Figura 19.** Registros de canal único del nAChR muscular en presencia de los distintos análogos de cafeína. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

Para comparar la potencia de los compuestos, se fue reduciendo en forma sistemática la concentración utilizada para los registros para determinar cuál era la mínima concentración capaz de producir activación, evidenciada por la detección de eventos en los registros. Determinamos que, para todos ellos, la mínima concentración fue  $0,1$  pM. Estos resultados indican que los análogos presentan una potencia mucho mayor que la de ACh y de cafeína, ya que con ninguno de estos dos ligandos se observó activación del nAChR muscular a concentraciones menores o iguales a  $1$   $\mu$ M.

Para concentraciones entre  $0,1$  pM y  $10$   $\mu$ M los histogramas de duración del estado abierto del canal fueron descriptos con dos componentes. La duración del componente más largo se mantuvo constante a este rango de concentraciones para cada compuesto y varió entre  $0,75$  y  $1,26$  ms para los diferentes compuestos (Tabla 3). Comparamos dicha duración con la duración del mismo componente en presencia de ACh y cafeína. Con respecto a ACh, la activación por C3, C5 y C6 no presentó diferencias estadísticamente significativas en la duración del estado abierto. Encontramos una leve disminución de dicha duración para C4 y C7 (Tabla 3). La cafeína posee un tiempo de estado abierto levemente menor que el de

ACh. Respecto a la cafeína, C4 y C7 no mostraron diferencias en la duración del canal abierto mientras que C3, C5 y C6 mostraron un leve incremento significativo (Tabla 3).

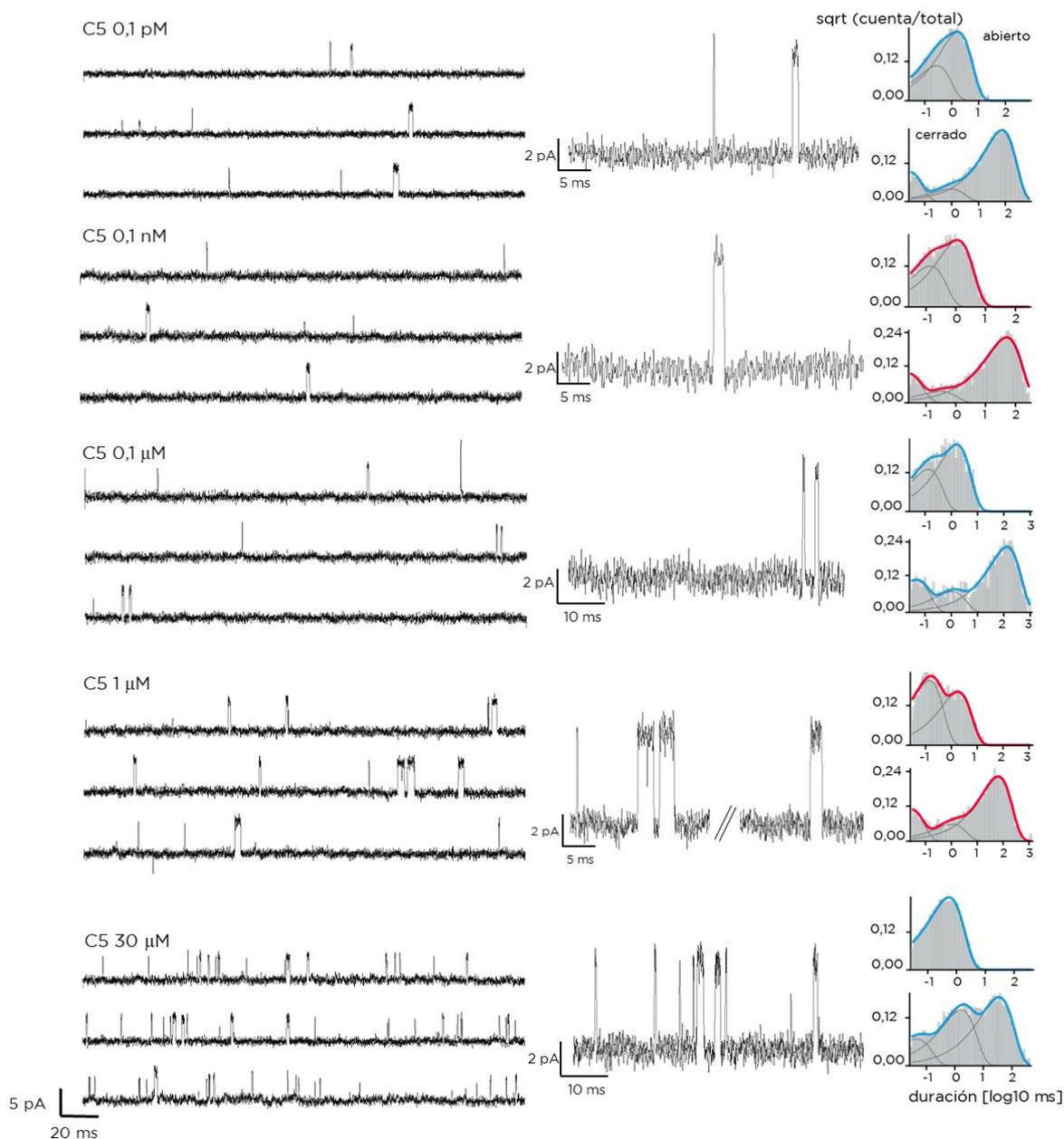
Compuesto	O <sub>1</sub> (ms)	n	Concentración mínima [ μM ]
ACh	1,36 ± 0,28	7	1 μM
Cafeína	0,76 ± 0,26	7	10 μM
C3	0,98 ± 0,28 #	6	0,1 pM
C4	0,87 ± 0,10 *	5	0,1 pM
C5	1,26 ± 0,29 #	15	0,1 pM
C6	1,22 ± 0,04 #	5	0,1 pM
C7	0,75 ± 0,15 *	5	0,1 pM

**Tabla 3.** Características a nivel de canal único de la activación del receptor muscular por ACh, cafeína o los distintos análogos de cafeína. “O<sub>1</sub>” corresponde a la duración del componente más largo del histograma de estado abierto. “n” corresponde al número de ensayos independientes para cada condición. El símbolo “\*” indica la comparación con ACh y el símbolo “#” con cafeína, p<0,05. A la derecha se muestra la mínima concentración requerida para observar eventos de apertura en registros de canal único.

Dado que todos los compuestos se comportaron en forma similar, se realizó un estudio más detallado de C5 para determinar su patrón de activación en función de la concentración. Se eligió C5 porque los registros presentaron mayor actividad con este compuesto y además porque produjo el mayor efecto observado por CrV. Se estudió un rango de concentraciones entre 0,1 pM y 30 μM (Figura 20).

Para todas las concentraciones se observaron eventos de  $5,5 \pm 0,5$  pA de amplitud, con un patrón de activación en forma de eventos aislados, y no se pudieron identificar *clusters* en ninguna de las concentraciones evaluadas. Sin embargo, a concentraciones

mayores a  $1\ \mu\text{M}$ , se observó con muy baja frecuencia la apertura de dos o hasta tres eventos sucesivos agrupados, formando *bursts* (Figura 20). La duración del componente de estado abierto más largo se mantuvo constante a las distintas concentraciones de C5 hasta  $30\ \mu\text{M}$ , cuyo valor fue similar al obtenido con  $30\ \mu\text{M}$  de ACh. A partir de  $30\ \mu\text{M}$  de C5 se observó una reducción de dicha duración, probablemente debida a un efecto de bloqueo del canal producido por el compuesto ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) (Tabla 4).



**Figura 20.** Registros de canal único del nAChR muscular en presencia de concentraciones crecientes de C5. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70\ \text{mV}$  de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

Compuesto	Concentración	O <sub>1</sub> (ms) (área)
C5	0,1 pM	1,21 ± 0,3 (0,55 ± 0,09)
C5	0,1 nM	1,42 ± 0,05 (0,67 ± 0,25)
C5	0,1 μM	0,99 ± 0,08 (0,67 ± 0,10)
C5	1 μM	1,34 ± 0,22 (0,89 ± 0,12)
C5	10 μM	0,86 ± 0,04 (0,87 ± 0,05)
C5	30 μM *	0,52 ± 0,01 (1 ± 0,00)

**Tabla 4.** Características a nivel de canal único de la activación del receptor muscular por distintas concentraciones de C5. “O1” corresponde a la duración del componente más largo del histograma de estado abierto. El símbolo “\*” indica la comparación con ACh,  $p < 0,05$ .

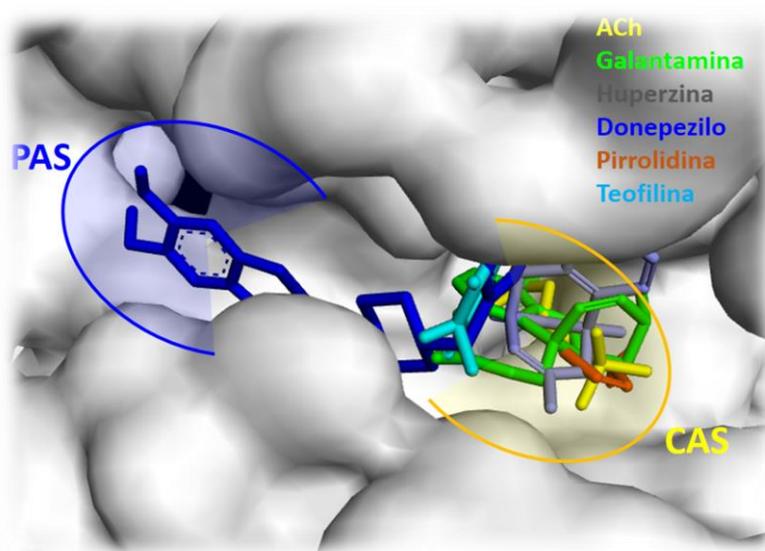
En resumen, los estudios de *patch clamp* indican que los análogos son agonistas del nAChR. Presentan mayor potencia que cafeína y ACh; sin embargo, se comportan como agonistas parciales de nAChR dado que no son capaces de producir su activación en forma de *clusters* a ninguna concentración.

### 3. SITIOS UNIÓN DE LOS ANÁLOGOS DE LA CAFEÍNA A LA ACETILCOLINESTERASA Y LOS nAChRs

Para intentar dilucidar los sitios de unión de los análogos de cafeína a la ACE y al nAChR se realizaron estudios de *docking* molecular.

Para los estudios sobre la ACE se utilizó la estructura que corresponde a la ACE humana cristalizada con donepezilo (Código: 4EY7.pdb; Cheung *et al.* 2012). Se realizaron en primer lugar controles con ACh, donepezilo, galantamina y huperzina (Cheung *et al.*, 2012), observándose que en todos los casos los distintos ligandos se ubicaban en regiones

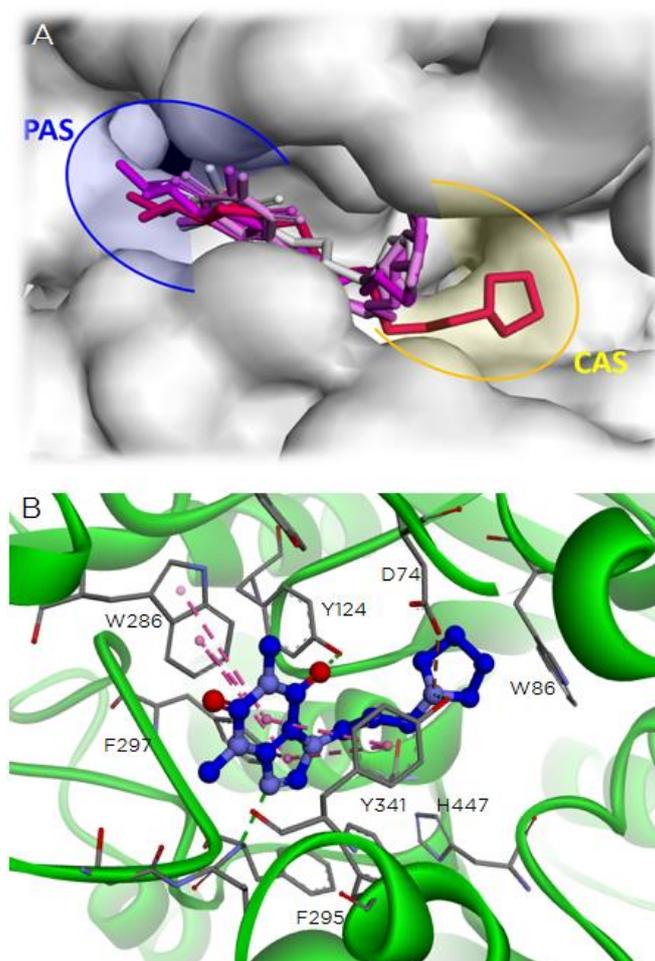
reportadas como los sitios específicos de unión (Quinn, 1987; Harel *et al.*, 1993; Kua *et al.*, 2003). Los ligandos ACh, galantamina y huperzina se ubicaron más favorablemente en una región definida por residuos que componen el sitio CAS (Figura 21). En cambio, el donepezilo se localizó de una forma más expandida ocupando tanto el sitio CAS como así también el sitio PAS de la enzima (Figura 21). Cuando las corridas se realizaron con las moléculas de pirrolidina y teofilina, moléculas que forman parte de la estructura de los análogos sintéticos de la cafeína, también se observó una localización fundamentalmente en el sitio CAS (Figura 21).



**Figura 21.** Docking molecular de Ach, galantamina, huperzina, donepezilo, pirrolidina y teofilina en la ACE (estructura 4EY7.pdb, Cheung *et al.*, 2012). Se ocultaron los residuos 72 al 86 para que se observen los sitios CAS y PAS.

Los estudios de *docking* molecular con los análogos de la cafeína mostraron que estos compuestos se localizan en ambos sitios funcionales, abarcando tanto el sitio CAS como el PAS, independientemente del largo de la cadena de carbonos (Figura 22 A). Todos los compuestos mostraron la capacidad de hacer contactos con residuos de estos sitios reportados como relevantes para su función farmacológica (Dvir *et al.*, 2010; Pohanka, 2011; Colovic *et al.*, 2013). En todos los casos se observó la potencial interacción del grupo pirrol de los distintos compuestos con los residuos W86, E202, y Y337 del subsitio anónico, y S203, H447 y E334 de la tríada catalítica del sitio CAS, todos reportados como relevantes para la actividad enzimática (Quinn, 1987, Figura 22 B). Por otro lado, la estructura correspondiente a teofilina mostró la capacidad de ubicarse en el sitio PAS, donde tendría el potencial de interaccionar con residuos aromáticos como W286 e Y72, los cuales fueron

sugeridos como importantes moduladores en la función de la enzima (Branduardi *et al.*, 2005; Johnson y Moore, 2006) (Figura 22 B).



**Figura 22.** Docking molecular de los distintos análogos sobre la ACE (estructura 4EY7.pdb, Cheung *et al.*, 2012). A) Localización de los compuestos C3-C7 (se muestran todos los compuestos con distintos colores) abarcando los sitios funcionales CAS y PAS. Se ocultaron los residuos 72 al 86 para una mejor visualización. B) Docking del compuesto C3. Se muestran los residuos de los sitios CAS y PAS que interactúan con el ligando. Puente de hidrógeno, verde; puente salino, naranja y enlaces  $\pi$ - $\pi$ , lila.

Se procedió luego a realizar los estudios sobre el nAChR. Para ello se utilizaron dos modelos de estructuras diferentes que presentan el *C-loop* en diferente conformación. El *C-loop* es esencial para desencadenar la activación del canal, pasando de una configuración abierta a una cerrada luego de la unión del agonista, lo que desencadena los cambios conformacionales que conducen a la apertura del canal (Billen *et al.*, 2012). Por otro lado, la bibliografía indica que los agonistas parciales que se unen al sitio de unión no presentan las mismas interacciones que la ACh, por lo que provocan el cierre parcial del *C-loop*

(Spurny *et al.*, 2015), lo que se postuló como un posible mecanismo responsable de la activación parcial del receptor.

Para los estudios de *docking* se utilizaron dos modelos distintos del nAChR, uno con el *C-loop* cerrado, para lo cual se usó como molde la estructura del receptor nicotínico  $\alpha 4\beta 2$  (código: 5KXI.pdb, Morales-Pérez, 2016), y otro con una conformación con su *C-loop* parcialmente cerrado, para lo cual usamos como molde la estructura de la proteína quimérica  $\alpha 7$ /AChBP (código: 5AFM.pdb, Spurny, 2015).

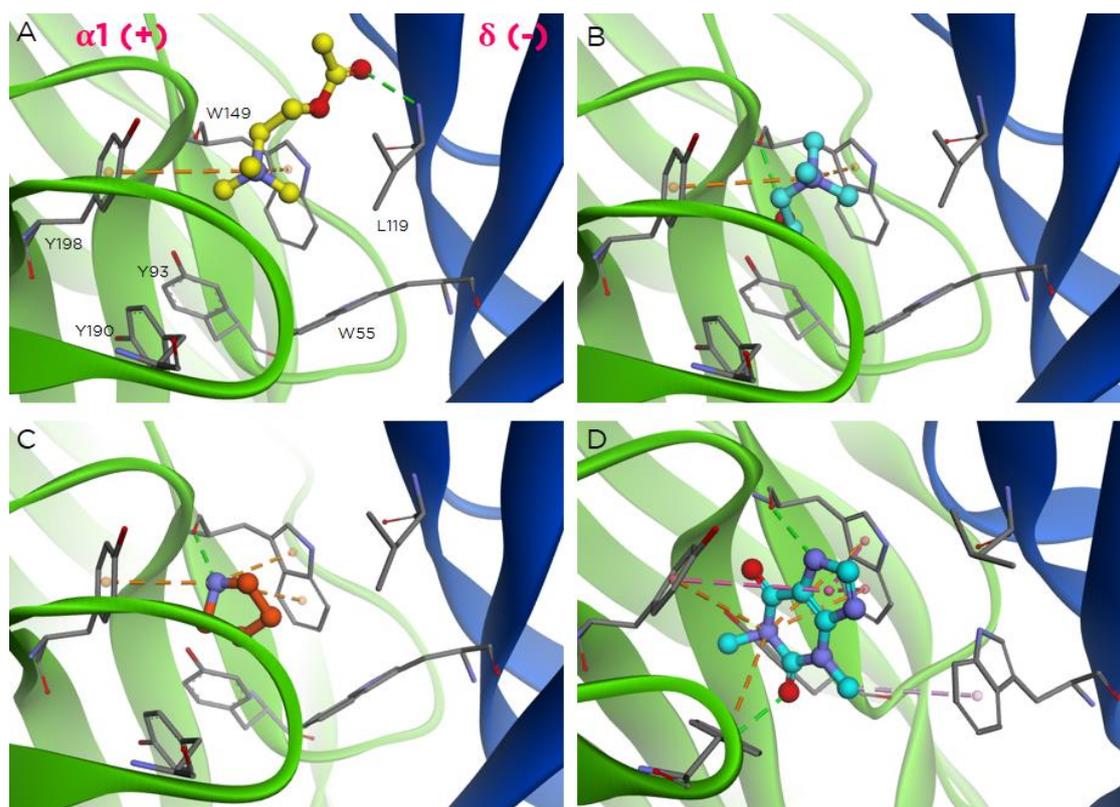
Se realizaron en primer lugar corridas de *docking* con ACh, como control de la conformación de unión de un agonista completo, y con colina, como control de la conformación de unión de un agonista parcial (Figura 23 A y B) sobre ambos modelos en las interfases  $\alpha 1\delta$  (Figura 23) y  $\alpha 1\epsilon$  (no mostrada). Los mejores resultados se obtuvieron con el modelo con el *C-loop* cerrado con ambos ligandos.

La ACh se unió en el sitio ortostérico (Figura 23 A) con una energía de unión de  $\sim 5.0$  Kcal/mol y una conformación que coincide con la que muestra en el cristal de la proteína unidora de ACh (AChBP) (código: 3WIP.pdb, Nayak *et al.*, 2016). Se observó que el grupo OH de la ACh tiene la capacidad de formar un puente de hidrógeno con el grupo amino de la cadena carbonada del residuo L119 de la cara complementaria, lo que permite orientar el grupo amino de la ACh para formar interacciones cation- $\pi$  con residuos aromáticos, tales como Y93, W149, Y190 y/o Y198 (de la cara principal) y W55 (de la cara complementaria). Estas interacciones han sido previamente reportadas como relevantes para su acción agonista (Dougherty, 2007).

La colina se unió al sitio ortostérico con una orientación diferente a la observada para ACh. En este caso la conformación más probable que se ubicó en el sitio de unión mostró la posibilidad de que el grupo OH de la colina forme un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de la cadena carbonada del residuo W149 (Figura 23 B). Esto provocó el desplazamiento del grupo amino de la colina, lo cual afectó su capacidad de formar el enlace cation- $\pi$  y redujo la energía de unión ( $\sim 3,5$  Kcal/mol) con respecto a lo observado para ACh. Estas observaciones han sido postuladas previamente como los mecanismos responsables de la acción parcial de la colina y de otros agonistas (Blum *et al.*, 2010; Hernando *et al.*, 2012; Bruhova y Auerbach, 2017).

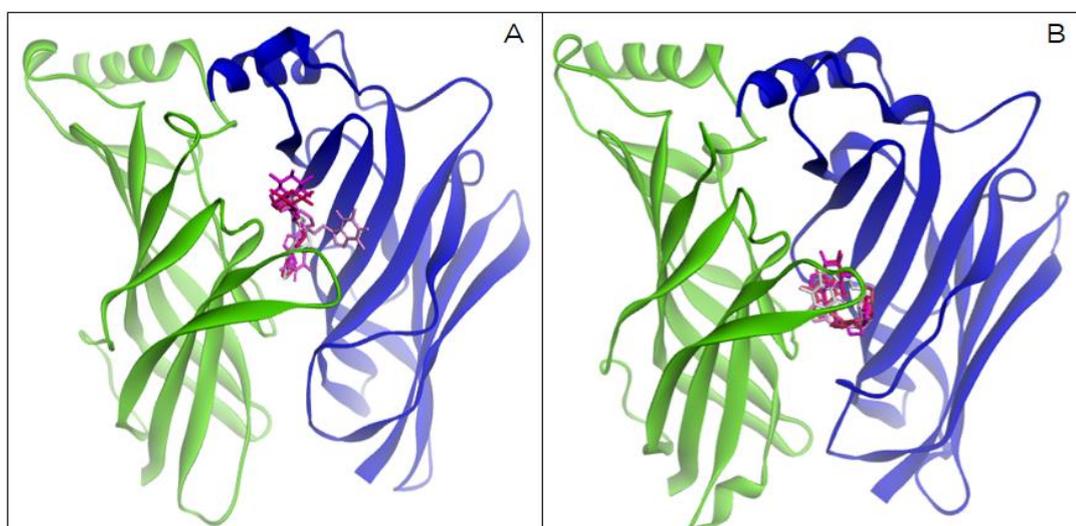
Se realizaron luego las corridas de *docking* con los ligandos pirrolidina y teofilina. Se observó que la pirrolidina necesita el *C-loop* cerrado para dar resultados más representativos, ya que con el *C-loop* parcialmente cerrado pocas veces se localizó en el sitio de unión. Observamos que las conformaciones más probables de pirrolidina en el sitio de unión fueron similares a las observadas con colina, con capacidad de formar enlaces

cation- $\pi$  con residuos aromáticos y puente de hidrógeno con el grupo carbonilo del residuo W149 (Figura 23 C), y con energías de enlace cercanas a las observadas para ACh ( $\sim -4,5$  Kcal/mol). Cuando se realizó el estudio de *docking* con teofilina se observó que fue necesario que el *C-loop* estuviera en la conformación parcialmente cerrada para permitir el ingreso del ligando. Las conformaciones más probables mostraron que teofilina tiene la capacidad de unirse al sitio ortostérico con una orientación que le permite generar interacciones cation- $\pi$  con los residuos aromáticos antes mencionados, principalmente con W149 de la cara principal (Figura 23 D), y un enlace puente de hidrógeno con el carbonilo de este mismo residuo (similar a colina y pirrolidina). A diferencia de los demás ligandos evaluados, la teofilina mostró mayor energía de enlace ( $\sim -5,5$  Kcal/mol) y la capacidad de interactuar con el residuo W55 (del lado complementario) con enlaces del tipo  $\pi$ - $\pi$ . Los tipos de enlaces que forma y la necesidad de que el *C-loop* se encuentre en una conformación parcialmente cerrada serían indicios de los mecanismos que llevan a que la teofilina se comporte como un agonista parcial.



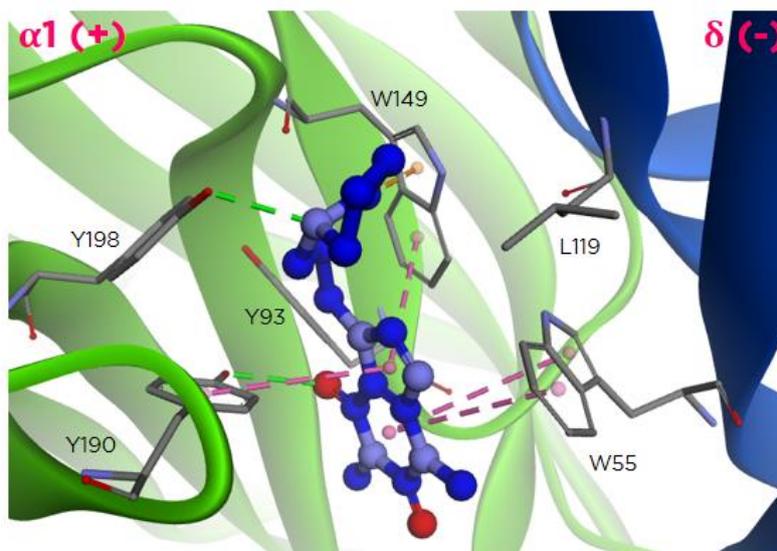
**Figura 23.** *Docking* de las distintas moléculas en las interfases  $\alpha 1$  y  $\delta$  modeladas a partir de la estructura con el *C-loop* cerrado (código 5KXL.pdb; A, B y C, *C-loop* cerrado) o a partir de la estructura con el *C-loop* parcialmente cerrado (código 5AFM.pdb; D). Se muestra la cara principal (+) en verde y la cara complementaria (-) en azul, los residuos principales del sitio ortostérico y las distintas interacciones de cada molécula con los mismos como líneas de trazos: cation- $\pi$  (naranja), puente de hidrógeno (verde) y  $\pi$ - $\pi$  (lila). A) ACh, B) colina, C) pirrolidina y D) teofilina.

Para evaluar las posibles interacciones de los análogos sintéticos de la cafeína (compuestos C3-C7) se realizaron estudios de *docking* sobre ambos modelos del receptor muscular (modelo con el *C-loop* cerrado y modelo con el *C-loop* parcialmente cerrado). Se observó que ninguno de los compuestos mostró la capacidad de ingresar al sitio ortostérico cuando utilizamos el modelo con el *C-loop* cerrado (Figura 24 A). En cambio, cuando se utilizó el modelo con el *C-loop* parcialmente cerrado todos los compuestos se unieron en el sitio ortostérico (Figura 24 B) con una frecuencia y energía de unión similares, ~20 % y ~ -8,0 Kcal/mol, respectivamente.



**Figura 24.** *Docking* de los compuestos C3-C7 sobre ambos modelos del nAChR muscular. A) *C-loop* cerrado (código 5KXI.pdb) y B) *C-loop* parcialmente cerrado (código 5AFM.pdb). Se muestra la cara principal (+) en verde y la cara complementaria (-) en azul.

Todos los compuestos mostraron la capacidad de formar interacciones catión- $\pi$  con los residuos W149, Y93, Y190 y/o Y198. Además, se observaron interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  con el residuo W55 del lado complementario, ya reportado previamente para otros compuestos y que podría tener una función relevante para la acción agonista parcial según lo reportado para otros receptores (Blum *et al.*, 2010; Hernando *et al.*, 2012; Turani *et al.*, 2018) (Figura 25).



**Figura 25.** Docking del compuesto C3 en las interfases  $\alpha 1$  y  $\delta$  modeladas a partir de la estructura con el *C-loop* parcialmente cerrado (código 5AFM.pdb). Se muestra la cara principal (+) en verde y la cara complementaria (-) en azul, los residuos principales del sitio ortostérico y las distintas interacciones de la molécula con los mismos como líneas de trazos: cation- $\pi$  (naranja), puente de hidrógeno (verde) y  $\pi$ - $\pi$  (lila).

En conclusión, los análogos de la cafeína inhiben a la ACE localizándose tanto en el sitio CAS como en el PAS y que se comportarían como agonistas parciales de los nAChRs debido a que impiden el cierre completo del *C-loop* y generan interacciones con los residuos del sitio ortostérico compatibles con los de algunos agonistas parciales ya conocidos.

## DISCUSIÓN

El capítulo III de este trabajo de Tesis se enfocó en la búsqueda de compuestos que presenten una actividad biológica dual: inhibidores de la ACE y activadores/agonistas del nAChR. El estudio fue iniciado a partir de un *screening* de la actividad anticolinesterásica de extractos metanólicos obtenidos a partir de hojas de distintas plantas popularmente conocidas y a las que le han sido asignadas diferentes propiedades medicinales. Se utilizaron para esto las hojas de *Peumus boldus* (boldo), *Laurus nobilis* (laurel), *Lippia turbinata* (poleo), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Camellia sinensis* (té rojo) y *Tilia platiphyllos* (tilo). El mayor poder de inhibición de la ACE lo presentó el extracto de té rojo, con un valor de IC<sub>50</sub> de 0,043 mg/ml. Con respecto al nAChR, observamos, mediante estudios de fluorescencia, que este extracto produjo perturbaciones en el estado conformacional del nAChR de *T. californica*, lo que sugirió una modulación de la función de este receptor.

El té, obtenido a partir de las hojas de *Camellia sinensis*, es una de las bebidas más populares en el mundo, a la que se le han asignado diversas propiedades medicinales desde hace siglos. Algunos de los efectos beneficiosos que se le otorgan sobre la salud son la reducción de lípidos en sangre, descenso de peso y actividades antimicrobianas, antioxidantes y anticarcinogénicas, entre otras (Hamilton-Miller, 1995; Hamilton-Miller, 2001; Chan *et al.*, 2011). El efecto inhibitor de la ACE observado en el extracto de té rojo es similar a resultados reportados previamente para té verde y té negro (Karadsheh *et al.*, 1991; Okello *et al.*, 2012), sugiriendo esto que en estos 3 tipos de tés se encuentra presente el compuesto responsable del efecto de inhibición observado. Estudios llevados a cabo con estos tres diferentes tipos de tés (verde, rojo y negro) mostraron que el contenido de catequinas en los mismos se correlacionaba de manera directa con el efecto neuroprotector asignado al té (Singh *et al.*, 2011; Schimidt *et al.*, 2017). El té verde mostró la mayor actividad neuroprotectora y se sugirió que esto podría deberse al alto contenido de (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), que no se encuentra presente en el resto de los tés. Dado que los tés rojo y negro carecen de EGCG, pero igualmente poseen efectos neuroprotectores (Schimidt *et al.*, 2017), postulamos que debía existir otro compuesto común a los tres tés responsable de los efectos observados.

Para identificar este compuesto, se realizó un fraccionamiento bioguiado del extracto metanólico de *C. sinensis* utilizando solventes de polaridad creciente. La mayor actividad inhibitor de la ACE fue hallada en la fracción de DCM. Por TLC y análisis de RMN pudimos identificar al compuesto activo presente en este extracto, que resultó ser

cafeína. Si bien estudios previos habían reportado el efecto inhibitorio de la cafeína sobre la ACE (Pohanka y Dobes, 2013), hasta el momento no existía información sobre los efectos de la cafeína en el nAChR. Por lo tanto, postulamos que la cafeína podría ser el agente común presente en todos los tipos de tés, responsable, al menos en parte, de los efectos benéficos observados.

En este capítulo se demostró que la cafeína induce cambios conformacionales en el nAChR muscular, similares a los producidos por el agonista ortostérico carb y por el agonista alostérico galantamina. Sin embargo, la potencia de este efecto fue diferente cuando se trató de cafeína ( $IC_{50}$  de 98,1  $\mu$ M) o de carb ( $IC_{50}$  de 0,12  $\mu$ M), sugiriendo esto que la cafeína actuaría como un agonista parcial del nAChR. Mediante experimentos de competencia entre cafeína y  $\alpha$ -BTX utilizando la sonda fluorescente CrV, se observó que una vez que la  $\alpha$ -BTX se encuentra unida al nAChR, concentraciones bajas de cafeína no producen perturbaciones en el estado conformacional del nAChR. La  $\alpha$ -BTX se une al nAChR bloqueando el acceso al mismo de los ligandos ortostéricos, manteniendo de esa forma al receptor en un estado de reposo (Moore y McCarthy, 1995). Dos posibles hipótesis podrían explicar los resultados observados: que la unión de la  $\alpha$ -BTX al sitio agonista impida la unión de la cafeína a este sitio, o bien que la presencia de la  $\alpha$ -BTX bloquee los caminos alostéricos necesarios para que ocurran cambios conformacionales en el nAChR y de esa manera, aunque la cafeína se una a sitios alostéricos, no pueda provocar ningún cambio en el estado conformacional del receptor.

Experimentos de *binding* utilizando Alexa 488- $\alpha$ -BTX y cafeína o galantamina demostraron, tanto en el nAChR muscular como en  $\alpha$ 7, que la toxina fluorescente y la cafeína o la galantamina no compiten por un mismo sitio en el nAChR, confirmando que tanto la cafeína como la galantamina activan al nAChR desde sitios alostéricos.

Mediante estudios de canal único se corroboró que la cafeína se comporta como agonista de los nAChRs muscular y  $\alpha$ 7. Se observó que la cafeína activa al nAChR muscular en forma de aperturas aisladas sin formación de *clusters*, incluso a concentraciones altas, y que también produce la activación del nAChR  $\alpha$ 7. Estos resultados confirman que la cafeína actúa como un agonista de baja eficacia para estos receptores. Los registros de canal único realizados con cafeína en presencia de ACh mostraron además una clara reducción de la duración del tiempo de estado abierto y un aumento de la duración de los *clusters* en función de la concentración de cafeína, sugiriendo esto que la cafeína actúa además como un bloqueador de canal abierto del nAChR muscular.

Para profundizar en esta idea se realizaron experimentos de competencia entre  $\alpha$ -BTX y cafeína en altas concentraciones en membranas de ricas en nAChR *T. californica*. Se observó que la  $\alpha$ -BTX por sí sola no produce cambios en los valores de *KD* del CrV para el estado de reposo. Valiéndose de la fluorescencia intrínseca del nAChR como una estrategia para monitorear los cambios conformacionales del receptor, Kawai y Raftery (2010) reportaron que con la sola presencia de  $\alpha$ -BTX no se observan cambios, lo que se condice con nuestros resultados (Kawai y Raftery, 2010). Más aún, mediante análisis del patrón de incorporación de 3-(trifluoromethyl)-3-(m-[125I]iodophenyl)diazirine ([125I]TID) fotomarcada al nAChR, Moore y McCarthy (1994) concluyeron que la  $\alpha$ -BTX aumenta/estabiliza la cantidad de nAChR en el estado de reposo (Moore y McCarthy, 1994). Sin embargo, en presencia de  $\alpha$ -BTX, altas concentraciones de cafeína produjeron aumentos de los valores de *KD* mayores a los observados para el nAChR en estado de reposo. Esto sugiere que la cafeína, a altas concentraciones y sin posibilidad de actuar como activador del nAChR, disminuye aún más la afinidad del CrV por el nAChR. Teniendo en cuenta que el CrV se une en el poro del canal a sitios antagonistas no competitivos, probablemente este incremento de los valores de *KD* corresponda a un desplazamiento del CrV de esos sitios. Para corroborar esta hipótesis, experimentos similares fueron realizados en presencia de QX-314, un derivado de la lidocaína que actúa como un bloqueador de canal abierto (Pascual y Karlin, 1998; Yu *et al.*, 2003). El QX-314 por sí solo no indujo ningún cambio en los valores de *KD* del CrV para el nAChR en estado de reposo. Estudios previos reportaron que la mayoría de los compuestos clasificados como bloqueadores de canal abierto se unen al nAChR en estado de reposo con una afinidad similar (Moore y McCarthy, 1995), sugiriendo esto que la presencia de QX-314 no perturba la conformación de reposo del nAChR. Sin embargo, en presencia de  $\alpha$ -BTX, el QX-314 produjo un marcado aumento de los valores de *KD*, apoyando la idea de que este aumento puede estar relacionado con un desplazamiento del CrV del canal iónico. Considerando que tanto en ausencia como en presencia de  $\alpha$ -BTX el QX-314 se ubica en el poro del canal y que solo en presencia de la misma el valor de *KD* se ve aumentado significativamente, una explicación podría ser que la  $\alpha$ -BTX desencadena cambios conformacionales en el vestíbulo del nAChR, no detectables por CrV o por medición de la fluorescencia intrínseca del nAChR, exponiendo de esa manera las moléculas de CrV que pueden ser así fácilmente desplazadas por el QX-314 o por la cafeína. Esta posibilidad sugiere, además, que la cafeína podría comportarse como un bloqueador de canal abierto a altas concentraciones.

Efectos similares a los observados con bajas y altas concentraciones de cafeína fueron obtenidos con galantamina (agonista parcial y bloqueador de canal abierto del

nAChR; Akk, 2005). Experimentos de competencia fueron realizados con  $\alpha$ -BTX y altas concentraciones de galantamina, confirmando el aumento de los valores de  $KD$  y, de esa manera, el desplazamiento del CrV del canal iónico y el comportamiento como bloqueador de canal abierto de esta droga a altas concentraciones.

Los experimentos de fluorescencia y electrofisiología llevados a cabo mostraron que la cafeína produce dos efectos diferentes sobre el nAChR: activador y bloqueador de canal abierto, lo que probablemente se corresponda con la unión de esta molécula a sitios diferentes del nAChR con afinidades diferentes. Los experimentos de competencia entre la  $\alpha$ -BTX y la cafeína sugirieron que el sitio de inhibición es el poro del canal iónico.

La cafeína, un alcaloide del grupo de las xantinas, es el estimulante con propiedades psicoactivas más consumido a nivel mundial (Christopher *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2015; Cappelletti *et al.*, 2016). A concentraciones bajas a moderadas (50-300 mg) promueve distintas funciones, tales como la vigilancia, la atención, y la cognición, entre otras (Fredholm *et al.*, 1999; Smith, 2002). A partir de la administración oral, la cafeína es absorbida rápidamente, y el pico en la concentración plasmática ocurre aproximadamente 15 o 20 minutos luego del consumo. Sus efectos biológicos abarcan un amplio rango de blancos moleculares, dentro de los cuales se encuentran: i) receptores de adenosina, donde las xantinas actúan como agonistas; ii) fosfodiesterasas, donde las xantinas actúan como inhibidores; iii) receptores de rianodina en el retículo sarcoplasmático y endoplasmático, donde las xantinas actúan sensibilizando a los mismos a la activación por calcio, y iv) receptores GABA, donde las xantinas actúan como antagonistas. Hasta hace algunos años, el único mecanismo que se conocía en el que interviene la cafeína en concentraciones cercanas a las concentraciones fisiológicas (rango micromolar) era la modulación de los receptores de adenosina; concentraciones de cafeína en sangre alcanzadas por la ingesta de una sola taza de café son suficientes para desplazar la adenosina endógena de sus receptores de tipo  $A_1$  y  $A_2$  (Fredholm, 1995; Xu *et al.*, 2010). La activación de receptores de rianodina o la inhibición de fosfodiesterasas se ha descrito a concentraciones más altas (rango milimolar) y por lo tanto tóxicas a niveles plasmáticos (Daly, 2007; Guerreiro *et al.*, 2008; Kolahdouzan y Hamadeh, 2017).

Debido a su naturaleza hidrofóbica la cafeína puede atravesar la barrera hematoencefálica, y de esa forma la concentración cerebro espinal de la misma igualar la concentración plasmática (Fredholm *et al.*, 1999; Kolahdouzan y Hamadeh, 2017). Investigaciones previas han reportado que actúa principalmente a nivel del sistema nervioso central, aumentando la concentración y la excitación y disminuyendo la fatiga (Kim *et al.*, 2015). Si bien sus efectos a largo plazo aun no son conocidos en su totalidad,

diferentes estudios en animales sugieren que posee efectos neuroprotectores (Schwarzschild *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2017; Schimidt *et al.*, 2017). Otros estudios han sugerido que el consumo de cafeína está inversamente asociado con el riesgo de padecer EA o déficits cognitivos (Okello *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2015). Diferentes modelos *in vivo* demostraron los efectos protectores de la cafeína en la EA (Dall'Igna *et al.*, 2007). Hoy en día existe consenso sobre el hecho de que la cafeína promueve la supervivencia neuronal en la EA, lo que podría contribuir a sus efectos benéficos. Distintos ensayos clínicos han demostrado efectos beneficiosos en la progresión y prevención de la EA; por ejemplo, la cantidad de cafeína que se ingiere durante un período de 20 años está inversamente asociada con el riesgo de padecer la EA, y el consumo de 3 a 5 tazas de café por día ha sido asociado con una disminución del riesgo de desarrollar demencia cercana al 65 % (Ng *et al.*, 2015). Se ha descrito que la cafeína reduce los niveles de A $\beta$  y la neurotoxicidad que este péptido ocasiona, así como el mejoramiento de la función cognitiva en modelos de ratones con EA. En ratones transgénicos que presentaron una mutación en la APP (APP-swe), en la que el clivaje por la enzima  $\beta$ -secretasa se ve aumentado causando la hiperfosforilación de la proteína tau y la aparición temprana de la EA, la cafeína previno y disminuyó el deterioro cognitivo (Arendash *et al.*, 2006, 2009).

A pesar de estos hallazgos, los mecanismos que subyacen a estos efectos benéficos aún permanecen sin conocerse. Los resultados de este capítulo junto con resultados de estudios previos, indican que la ACE es también un blanco molecular de la cafeína a concentraciones micromolares (Pohanka y Dobes, 2013). En esta sección se describió por primera vez la acción de la cafeína sobre los nAChRs en concentraciones micromolares, lo que convierte a este receptor en un nuevo blanco molecular de gran importancia.

Se postula a la cafeína como una molécula bioactiva, molécula líder, que ejerce un efecto dual en las vías colinérgicas, actuando como un inhibidor de la ACE y como un activador de los nAChR. La cafeína es un compuesto con una alta solubilidad tanto en agua como en solventes no polares. Esta propiedad química vuelve a esta molécula por demás interesante ya que facilita la partición a través de las membranas plasmáticas, permitiéndole alcanzar niveles de concentración altos en todo el cuerpo, incluyendo en el cerebro (Kolahdouzan y Hamadeh, 2017). Es por todo esto que la cafeína debe ser considerada para el diseño de nuevas drogas dirigidas a múltiples blancos para el tratamiento de la EA. En esta tesis se reafirma a la ACE como un blanco molecular de la cafeína y se introduce al nAChR como un nuevo blanco de acción.

La segunda parte de este tercer capítulo consistió en el diseño, síntesis y evaluación de análogos de la cafeína, molécula líder, con el fin de obtener compuestos que, al igual que esta, inhiban a la ACE y activen al nAChR con una mayor potencia y selectividad. Utilizando las moléculas de teofilina y pirrolidina como sustratos iniciales, se obtuvieron distintos análogos sintéticos que difirieron en el largo de la cadena de carbonos que conecta ambas moléculas, a los que llamamos C3, C4, C5, C6 y C7.

Inicialmente se evaluó la capacidad de los distintos análogos de cafeína sintetizados para inhibir la ACE. La cafeína presentó un valor de  $IC_{50}$  de 48,61  $\mu$ M, y si bien la única diferencia con respecto a la molécula de teofilina es la presencia de un grupo metilo, para esta última se observó un valor de  $IC_{50}$  de 473,01  $\mu$ M. Esta pequeña diferencia entre ambas moléculas puso de manifiesto la significatividad de la estructura para la potencia del compuesto, y señaló la posición estructural (N7 de la teofilina) en la que era indicado incorporar nuevos sustituyentes. La pirrolidina, por otro lado, no mostró capacidad para inhibir a la ACE. Sin embargo, al ser la parte de la estructura de la nicotina que ofrece uniones cruciales a nivel del sitio activo de los nAChRs, se la utilizó para combinarla con la estructura original de la teofilina mediante una cadena hidrocarbonada. Los resultados obtenidos mostraron que los análogos sintéticos presentan una mayor potencia que la cafeína en la inhibición de la ACE y, por lo tanto, también con respecto a los precursores teofilina y pirrolidina. El  $IC_{50}$  de los distintos compuestos disminuyó acorde al aumento del número de carbonos de la cadena espaciadora entre la teofilina y la pirrolidina, siendo el compuesto C7, con un  $IC_{50}$  de 0,22  $\mu$ M, el de mayor poder de inhibición.

Para identificar el sitio de acción de estos compuestos en la enzima ACE, se realizaron estudios de *docking* molecular. Las moléculas pirrolidina y teofilina se localizaron preferentemente en el sitio CAS. Si bien los estudios no se realizaron con la molécula de cafeína, se supuso que dada la semejanza de su estructura con la de la teofilina, la misma también se localizaría principalmente en el sitio CAS. Los resultados obtenidos con los análogos de la cafeína mostraron que los mismos se localizan en ambos sitios funcionales, abarcando tanto el sitio CAS como el PAS, independientemente del largo de la cadena espaciadora. Es decir, la estructura que corresponde al grupo pirrol en las moléculas de C3, C4, C5, C6 y C7 se localiza en el sitio CAS de la ACE, mientras que la que corresponde a la teofilina lo hace principalmente en el sitio PAS. La ocupación de ambos sitios podría explicar el aumento significativo del poder inhibitorio de los compuestos con respecto a la teofilina y a la pirrolidina. Es importante considerar además que todos los compuestos mostraron energías de unión semejantes (8,0 Kcal/mol).

Otro de los blancos terapéuticos interesantes en la EA que se estudió en este trabajo de Tesis es el receptor nicotínico. En este capítulo se estudiaron tanto los cambios conformacionales como la funcionalidad del mismo provocados por su interacción con los distintos análogos. Al estudiar los cambios conformacionales del nAChR ocasionados por las dos moléculas precursoras de los análogos, se observó que la pirrolidina produjo cambios en la conformación del receptor, mientras que la teofilina no provocó alteraciones de su estado conformacional. Esto es contrario a lo que se observó con respecto a la actividad de ambas moléculas sobre la ACE, lo que confirma que, si bien ambos blancos moleculares comparten el mismo ligando natural (ACh), este tiene conformaciones farmacofóricas diferentes en cada caso.

Cuando se estudió la interacción de los análogos sintéticos con el nAChR, se observaron diferencias importantes de acuerdo al largo de la cadena de carbonos de los compuestos. Tanto los compuestos C3 como C7 no produjeron modificaciones en el estado conformacional del nAChR incluso a altas concentraciones. Es decir, el receptor se mantuvo en un estado correspondiente a un estado de reposo. Cuando las membranas de *T. californica* se incubaron con C4 fueron necesarias altas concentraciones del compuesto (>200  $\mu\text{M}$ ) para producir cambios en los valores de  $KD$  del CrV, los cuales fueron similares a los obtenidos para el nAChR en estado desensibilizado. En presencia de C5 y C6, los valores de  $KD$  del CrV fueron prácticamente iguales a los obtenidos en presencia de carb, incluso en concentraciones muy bajas de ambos compuestos (<1  $\mu\text{M}$ ). Esto indica que ambos compuestos en muy bajas concentraciones son capaces de llevar al receptor a un estado desensibilizado.

Para profundizar en el estudio de la interacción entre los distintos compuestos y el nAChR, se evaluó la funcionalidad del mismo en presencia de los distintos análogos sintéticos obtenidos. A una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y en ausencia del agonista ACh, todos los compuestos fueron capaces de producir la activación del nAChR muscular. En todos los casos se observaron aperturas en forma de eventos aislados, lo que podría indicar que estos compuestos se comportan como agonistas parciales del receptor. Además, no fue posible encontrar diferencias entre los compuestos en cuanto a la mínima concentración de activación, ya que para todos ellos se observó la presencia de canales a concentraciones de hasta 0,1 pM. Todos los análogos sintéticos, independientemente del largo de cadena, presentaron una potencia mucho mayor que la de cafeína, ya que con esta no se observó activación del nAChR muscular a concentraciones menores o iguales que 1  $\mu\text{M}$  (Fabiani *et al.*, 2018).

Debido a que los compuestos se comportaron de forma similar se realizó un estudio más detallado para el compuesto C5, ya que este mostró una mayor actividad en los registros obtenidos y, además, produjo el mayor efecto en cuanto a los cambios conformacionales del receptor medidos por CrV. Se observó activación del nAChR muscular a concentraciones de entre 0,1 pM y 30  $\mu$ M. En todos los casos se observaron eventos aislados, sin poder identificar *clusters* en ninguna de las concentraciones. A concentraciones mayores de 1  $\mu$ M se observaron, en algunos casos, aperturas de dos o hasta tres eventos sucesivos en forma de *bursts*. Además, a concentraciones de 30  $\mu$ M se observó una reducción del tiempo de estado abierto del canal, lo que podría deberse a un bloqueo del canal producido por este compuesto en más altas concentraciones, similar a lo descrito para cafeína. Los resultados de *patch clamp* demostraron que los análogos de cafeína son agonistas del nAChR muscular. Los compuestos obtenidos presentan una potencia mayor que la cafeína y que la ACh, aunque su eficacia con respecto a esta última es menor (actuando como agonistas parciales) dado que en ningún caso se observó la activación en forma de *clusters*.

Para estudiar los sitios de unión de estos compuestos al nAChR muscular se realizaron estudios de *docking* molecular para lo cual realizamos los modelos por homología de las interfases  $\alpha 1\delta$  y  $\alpha 1\epsilon$  del receptor muscular. Se utilizó como molde para el modelado la estructura del receptor  $\alpha 4\beta 2$  cristalizada con nicotina, la cual presenta el *C-loop* cerrado (código 5KXI.pdb, Morales-Pérez *et al.*, 2016) y la estructura de la quimera  $\alpha 7$ /AChBP cristalizada con el agonista parcial lobalina, la cual presenta el *C-loop* parcialmente cerrado (código 5AFM.pdb, Spurny *et al.*, 2015), ya que se ha postulado que algunos agonistas parciales que se unen al sitio de unión ortostérico no presentan las mismas interacciones que la ACh y provocan, además, el cierre parcial del *C-loop* (Spurny *et al.*, 2015).

A partir del *docking* de ACh, colina y pirrolidina en el modelo con el *C-loop* cerrado se observaron interacciones con residuos reportados como importantes para la activación del receptor (como interacciones cation- $\pi$  con el residuo W149) en el modelo con el *C-loop* cerrado. Estas interacciones mostraron diferencias entre los distintos ligandos acordes con su acción como agonista completo, para la ACh, y como agonista parcial, para la colina y la pirrolidina. Todos los análogos sintéticos de la cafeína (C3-C7), así como también la teofilina, se localizaron en el sitio de unión agonista del modelo con el *C-loop* parcialmente cerrado, tanto en la interfase  $\alpha 1\delta$  como  $\alpha 1\epsilon$ . Además, no se observaron diferencias ni en frecuencia ni en energía de unión entre los distintos compuestos ni entre las distintas interfases. Todos los compuestos presentaron interacciones con los residuos W149, Y93,

Y190 y/o Y198, residuos reportados como relevantes para la acción agonista (Billen *et al.*, 2012; Post *et al.*, 2017). Este estudio de *docking* sugiere que los compuestos se unen con alta afinidad al sitio ortostérico del receptor, lo que podría explicar la alta potencia observada en los registros de electrofisiología, y que dicha unión promueve el cierre parcial del *C-loop* y la formación de enlaces con distintos residuos (tales como enlaces cation- $\pi$ ), lo que sugeriría la acción de estos compuestos como agonistas parciales del receptor.

En este capítulo de la Tesis se propone a la molécula de cafeína como una molécula líder bifuncional, que actuaría sobre dos blancos moleculares directamente implicados en la potenciación de la señal colinérgica, y por lo tanto como posible estrategia terapéutica para la EA. Además, se presentan 5 análogos de la misma con propiedades muy prometedoras, ya que presentan mayor potencia que la cafeína sobre ambos blancos moleculares.

# **CAPÍTULO IV**

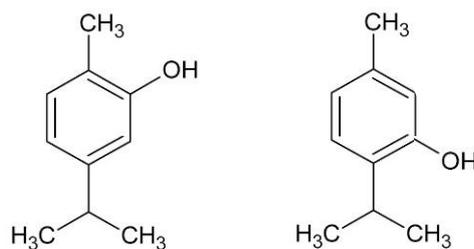
## **Modulación ortostérica y alostérica del receptor 5-HT<sub>3A</sub>**

## INTRODUCCIÓN

Los receptores de 5-HT tipo 3 (5-HT<sub>3</sub>), pertenecientes a la familia *Cys-loop*, convierten la unión del neurotransmisor 5-HT en una corriente catiónica que media respuestas excitatorias rápidas en el sistema nervioso central y periférico. Intervienen en el procesamiento de la ansiedad y la depresión, y en el control de la liberación de neurotransmisores. Se encuentran involucrados en la regulación de distintos procesos de aprendizaje y memoria durante la adultez y el envejecimiento; es por esto que ciertos cambios o desbalances en la señalización serotoninérgica se han asociado a distintas condiciones patológicas en el CNS, entre las que se incluye la EA (Lai *et al.*, 2003). En esta enfermedad se observó una disminución en el número de neuronas serotoninérgicas en distintas regiones cerebrales (Yamamoto y Hirano, 1985; Kovacs *et al.*, 2003), así como también una reducción de los niveles de 5-HT (Gottfries, 1990; Garcia-Alloza *et al.*, 2005).

La función de los receptores 5-HT<sub>3</sub> es modificada por varios y muy diferentes compuestos moduladores. Los moduladores ortostéricos negativos de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, como granisetron, alosetron, ondansetron y palanosetron, son utilizados para aliviar síntomas gastrointestinales asociados a la quimioterapia, anestesia y síndrome de intestino irritable (Spiller, 2011; Gilmore *et al.*, 2018; Juza *et al.*, 2020). A su vez, son considerados como una posible terapia para el tratamiento de otros desórdenes, tales como esquizofrenia, depresión, ansiedad, adicciones, disfunciones cognitivas y desórdenes de alimentación (Walstab *et al.*, 2010; Thompson, 2013; Juza *et al.*, 2020). Otros compuestos, entre los que se incluyen los alcaloides (Baptista-Hon *et al.*, 2011), esteroides (Oz *et al.*, 2002), cannabinoides (Oz, 2006) y distintos terpenos (Jarvis *et al.*, 2016; Al Kury *et al.*, 2018) han sido reportados como moduladores alostéricos negativos mediante su unión a cavidades dentro de la región transmembrana. Además, varios compuestos, entre los que se encuentran alcoholes (Lovinger y Zhou, 1998), 5-hidroxiindol (van Hooft *et al.*, 1997) y 5-Cl-indol (Newman *et al.*, 2013), han sido postulados como moduladores alostéricos positivos.

Ha sido demostrado que los terpenoides actúan como moduladores alostéricos de los receptores 5-HT<sub>3A</sub>, uniéndose, probablemente, a los sitios transmembrana de los mismos. Algunos actúan como moduladores negativos, como el mentol, la boldina o el citronelol (Barann *et al.*, 2000; Ashoor, 2013; Ziembra *et al.*, 2015; Jarvis *et al.*, 2016; Al Kury *et al.*, 2018), mientras que otros, como el carvacrol y el timol, presentes en los aceites esenciales del orégano y el tomillo, y en los cuales se centra este trabajo de Tesis, actúan como moduladores positivos con actividad agonista (ago-PAMs) (Lansdell *et al.*, 2015; Ziembra *et al.*, 2015) (Figura 1).



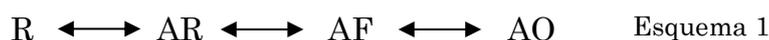
**Figura 1.** Estructura química del timol (izquierda) y el carvacrol (derecha).

Dentro de la familia de receptores *Cys-loop*, los receptores 5-HT<sub>3</sub> son los menos conocidos en cuanto a su mecanismo molecular de funcionamiento. La información relacionada con su activación y modulación fue obtenida principalmente a partir de estudios electrofisiológicos de corrientes macroscópicas (Mott *et al.*, 2001; Hapfelmeier *et al.*, 2003; Solt *et al.*, 2007; Landsell *et al.*, 2015). Sin embargo, los registros de corrientes macroscópicas no proveen información mecanística detallada y no permiten generar modelos cinéticos completos. La falta de registros de canales unitarios se debió a la baja conductancia de los receptores, especialmente del 5-HT<sub>3A</sub>, que impide la detección de eventos a partir de registros de canal único.

Para sortear esta limitación, Corradi y colaboradores (Corradi *et al.*, 2009) generaron un receptor mutante de 5-HT<sub>3A</sub> de ratón en el que intercambiaron tres residuos de arginina localizados en el dominio intracelular por los aminoácidos glutamina (Q), ácido aspártico (D) y alanina (A). Estos intercambios se basaron en trabajos de Kelley (2003), quienes demostraron que el intercambio de dichas argininas de la subunidad 5-HT<sub>3A</sub> por los residuos QDA, encontrados en posiciones homólogas en la subunidad 5-HT<sub>3B</sub>, aumentaban la conductancia del canal en el receptor 5-HT<sub>3A</sub>, demostrando así que estos residuos son determinantes de conductancia. De esta manera, se determinó que el receptor 5-HT<sub>3A</sub> de ratón mutado en las tres argininas incrementó su conductancia a un valor que fue posible detectarlo en registros de canal único y, por eso, se denominó 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> (de alta conductancia, por sus siglas en inglés, *high conductance*) (Corradi *et al.*, 2009). Mediante registros macroscópicos se determinó que las mutaciones no alteran las propiedades de activación y modulación y, combinado con los registros de canal único, se generó un modelo cinético para explicar el mecanismo de activación del 5-HT<sub>3A</sub> de ratón por 5-HT y por agonistas parciales (Corradi *et al.*, 2009, 2013).

Los resultados del análisis cinético del receptor homomérico de ratón 5-HT<sub>3A</sub> demostraron que si bien tiene 5 sitios de unión ortostéricos idénticos, solo 2 o 3 necesitan

estar ocupados para obtener una respuesta máxima (Mott *et al.*, 2001; Corradi *et al.*, 2009). Además, este análisis demostró la existencia de un estado cerrado pre-activado o intermedio, denominado *flipped* o *primed*. Este estado presenta alta afinidad por el agonista y se encuentra, en el esquema de activación, entre el receptor ya ocupado por el agonista y el estado abierto del canal, tal como se describe en el siguiente esquema simplificado lineal:



donde R es el receptor en reposo y con el canal cerrado; AR unido al agonista y con el canal cerrado; AF unido al agonista, en el estado preactivado y con el canal cerrado; AO unido al agonista y con el canal abierto.

La importancia del estado preactivado se debe a que limita la respuesta máxima evocada por agonistas parciales con respecto a la obtenida por agonistas totales. Es decir, se sugirió que los agonistas parciales generan una respuesta máxima menor con respecto a los agonistas completos debido a que tienen disminuida la velocidad de transición del receptor desde el estado en reposo con el agonista ligado hacia el estado preactivado. Este estado, y su importancia en el proceso de activación, fue postulado previamente para el receptor 5-HT<sub>3A</sub> de ratón, y también para otros miembros de la familia *Cys-loop*, tales como el nAChR y el receptor de glicina (Lape *et al.*, 2008; Corradi *et al.*, 2009; Mukhtasimova *et al.*, 2009; Corradi y Bouzat, 2014).

Al igual que el receptor de ratón, el receptor 5-HT<sub>3A</sub> humano presenta una muy baja conductancia, lo que imposibilita la detección de eventos de canal único mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* (Kelley *et al.*, 2003). Debido a esto, la activación y modulación de los receptores humanos 5-HT<sub>3</sub> había sido estudiada solamente mediante corrientes macroscópicas.

En el último capítulo de este trabajo de Tesis, a partir del modelo de receptor humano 5-HT<sub>3A</sub> de alta conductancia (5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub>), generado mediante la mutación de tres argininas del dominio intracelular a los residuos QDA antes mencionado, se obtuvieron registros de corrientes macroscópicas y de canales unitarios para revelar información mecanística novedosa sobre la activación ortostérica del receptor como así también sobre su activación y modulación alóstéricas por dos compuestos terpenoides, el timol y el carvacrol.

## OBJETIVOS

Considerando al 5-HT<sub>3</sub> como un blanco molecular interesante para el tratamiento de la EA, el **OBJETIVO GENERAL** del capítulo IV de este trabajo de Tesis fue conocer en detalle los mecanismos de activación y modulación del 5-HT<sub>3</sub>. En esta Tesis se tomó ventaja del receptor de alta conductancia, 5-HT<sub>3AHC</sub>, como una herramienta para estudiar en detalle dichos mecanismos.

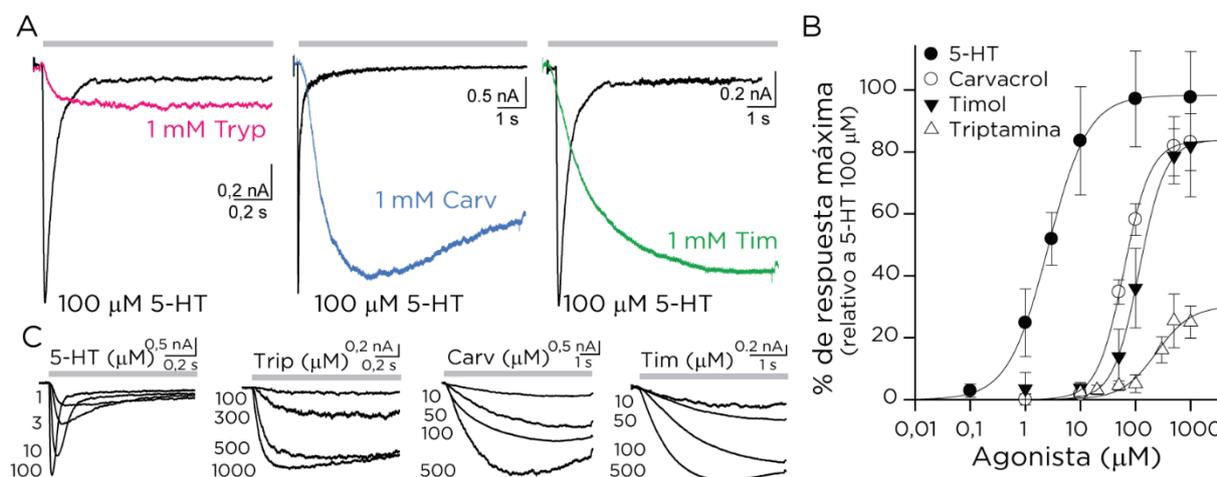
Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** del presente capítulo fueron:

- Caracterizar a nivel de canal único la activación del 5-HT<sub>3A</sub> humano en presencia de su agonista endógeno, 5-HT, y del agonista parcial triptamina.
- Determinar cómo es la potenciación mediada por los moduladores alostéricos del 5-HT<sub>3A</sub> humano, timol y carvacrol.
- Dilucidar el mecanismo de activación alostérica del 5-HT<sub>3A</sub> humano y establecer las diferencias con su activación ortostérica.

## RESULTADOS

### 1. ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> POR LIGANDOS ORTOSTÉRICOS Y ALOSTÉRICOS A NIVEL MACROSCÓPICO

Como punto de partida de este trabajo, lo primero fue realizar una caracterización de las propiedades de activación macroscópica del receptor 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> humano para demostrar que responde en forma similar al receptor nativo ya descrito. Se obtuvieron registros de corrientes macroscópicas a partir de células BOSC 23 transfectadas con el ADN<sub>C</sub> de la subunidad de este receptor. Luego de la aplicación de 100 μM de 5-HT, se observaron corrientes macroscópicas que decayeron durante el pulso de aplicación del agonista (Figura 1 A). El tiempo medio de activación (*rising time*), medido como el tiempo en que tarda en aumentar la señal desde el valor 10 % al 90 % del total de la corriente obtenida,  $t_{10-90\%}$ , fue de  $10 \pm 4$  ms, y los decaimientos de la corriente fueron ajustados por dos componentes exponenciales, cuyos tiempos fueron de  $92 \pm 20$  ms y  $1100 \pm 900$  ms ( $n=5$ ). Estos valores fueron similares a los observados luego de la activación del 5-HT<sub>3A</sub> humano por 100 μM de 5-HT ( $t_{10-90\%}$  de  $16 \pm 6$  ms y constantes de tiempo de decaimiento de  $120 \pm 50$  ms y  $700 \pm 400$  ms ( $n=5$ )). Se obtuvieron corrientes en la configuración *whole-cell* a distintas concentraciones de 5-HT (Figura 1C) y se midieron los picos, o amplitudes máximas, en función de la concentración del agonista para generar curvas dosis-respuesta (Figura 1B). A partir de la curva de dosis-respuesta se obtuvo un valor de EC<sub>50</sub> de  $2,6 \pm 0,1$  μM, similar a lo reportado previamente para el receptor nativo de baja conductancia 5-HT<sub>3A</sub> (Miles *et al.*, 2014; Corradi *et al.*, 2015; Lansdell *et al.*, 2015; Munro *et al.*, 2019). Cuando la activación se produjo con triptamina, un agonista parcial descrito previamente para el 5-HT<sub>3A</sub> de ratón (Corradi y Bouzat, 2014) se observaron corrientes que se activaron en forma más lenta (Figura 1 A y C) y que no decayeron durante el tiempo de aplicación del agonista. El tiempo medio de activación obtenido a concentraciones saturantes de triptamina (1 mM) fue de  $200 \pm 100$  ms. Las curvas de dosis-respuesta mostraron un EC<sub>50</sub> de  $197 \pm 50$  μM y una respuesta máxima de  $27 \pm 3$  % en relación a las corrientes originadas por 100 μM de 5HT (Figura 1 B). Estos resultados confirman que la triptamina es un agonista parcial del receptor 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> humano.



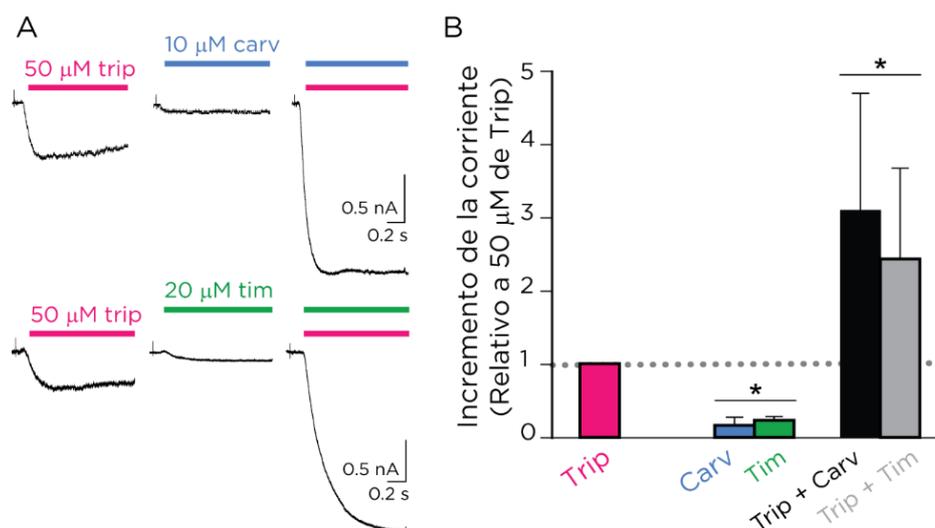
**Figura 1.** A) Corrientes macroscópicas obtenidas a partir del receptor 5-HT<sub>3AHC</sub> humano luego de la aplicación de 5-HT, triptamina, carvacrol o timol en las concentraciones indicadas. Potencial: -50 mV. B) Curvas de dosis-respuesta para los distintos agonistas. Las amplitudes fueron normalizadas con respecto a las corrientes obtenidas con 100 μM de 5-HT. Los datos corresponden a la media ± D.S. de 3 experimentos independientes. C) Corrientes obtenidas a diferentes concentraciones de cada agonista.

El carvacrol y el timol son dos monoterpenos fenólicos que han sido caracterizados macroscópicamente como agonistas alostéricos parciales y moduladores positivos del receptor 5-HT<sub>3A</sub> humano (Lansdell *et al.*, 2015; Ziemba *et al.*, 2015). Utilizando el receptor de alta conductancia, se obtuvieron registros de corrientes macroscópicas con estos compuestos en un rango de concentraciones de entre 1 y 1000 μM (Figura 1 B y C). Las corrientes macroscópicas observadas fueron similares para ambos agonistas, pero diferentes a las producidas por 5-HT. Para todas las concentraciones evaluadas, el decaimiento de las corrientes fue lento y no se alcanzó la caída completa durante el tiempo de aplicación del agonista (12 segundos) (Figura 1 C). Las corrientes obtenidas a partir de concentraciones saturantes, tanto de carvacrol como de timol, mostraron un perfil de activación significativamente más lento que lo observado con 5-HT, con tiempos medios de activación ( $t_{10-90}$  %) de  $2280 \pm 810$  ms para 1 mM de carvacrol y de  $4850 \pm 750$  ms para 1 mM de timol (Figura 1 A). Las curvas de dosis-respuesta mostraron valores de  $EC_{50}$  ( $62 \pm 2$  μM para carvacrol y  $117 \pm 30$  μM para timol) y de respuesta máxima ( $84 \pm 1$  % para carvacrol y  $84 \pm 8$  % para timol) similares a los reportados para el receptor salvaje (Lansdell *et al.*, 2015).

Estos resultados revelan que la activación ortostérica y alostérica del 5-HT<sub>3AHC</sub> es indistinguible de la del receptor salvaje y, por lo tanto, que el receptor de alta conductancia es un buen modelo para estudiar su activación y modulación a nivel de canal único.

## 2. POTENCIACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>3A</sub>HC POR CARVACROL Y TIMOL A NIVEL MACROSCÓPICO

Para estudiar la acción del carvacrol y el timol como moduladores alostéricos positivos del receptor 5-HT<sub>3A</sub>HC humano se registraron en primer lugar corrientes macroscópicas con 50  $\mu$ M de triptamina, una concentración cercana al valor de EC<sub>20</sub>, en ausencia o presencia de 10  $\mu$ M de carvacrol o 20  $\mu$ M de timol, que corresponden a concentraciones cercanas a los valores de EC<sub>10</sub> para estos compuestos (Figuras 1 y 2). Cuando la triptamina fue aplicada sola, se obtuvieron las respuestas típicas de activación lenta y decaimiento lento; la aplicación de timol o carvacrol a estas concentraciones produjo corrientes macroscópicas muy pequeñas o casi despreciables (Figura 2 A). Sin embargo, cuando se realizó la co-aplicación de triptamina (50  $\mu$ M) y carvacrol (10  $\mu$ M) o timol (20  $\mu$ M) se observó una marcada potenciación de las corrientes macroscópicas. Para ambos compuestos, el pico de la corriente aumentó cerca de 3 veces con respecto a las corrientes originadas por triptamina sola en la misma célula (Figura 2 B).



**Figura 2.** A) Corrientes macroscópicas producidas por la aplicación de 50  $\mu$ M de triptamina (rosa), 10  $\mu$ M de carvacrol (celeste), 20  $\mu$ M de timol, 50  $\mu$ M triptamina/10  $\mu$ M carvacrol y 50  $\mu$ M triptamina/20  $\mu$ M timol. Potencial de membrana: -50 mV. B) Incremento del pico de la corriente obtenida con triptamina luego de la aplicación de carvacrol (10  $\mu$ M) o timol (20  $\mu$ M). Los picos de corrientes fueron normalizados con respecto a los obtenidos con triptamina sola en la misma célula. Los valores corresponden a la media  $\pm$  D.S. de 3 experimentos independientes. “\*”= p<0,001.

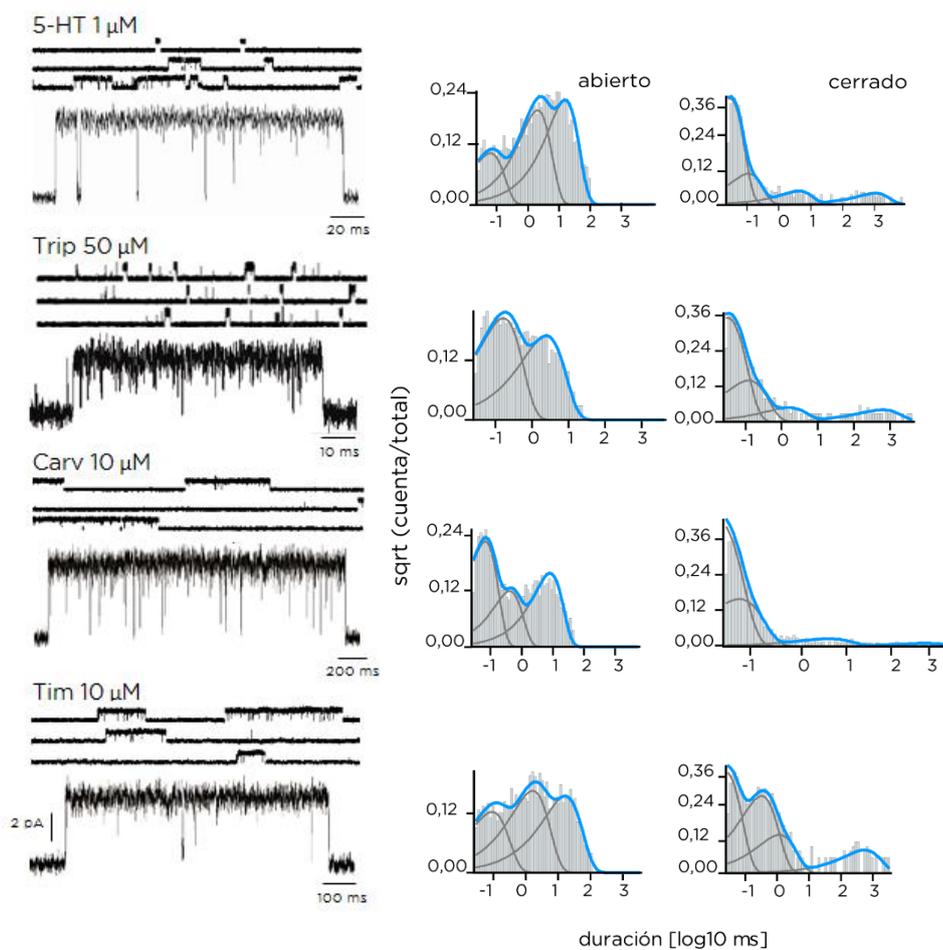
Estos resultados confirman que, además de actuar como agonistas, el carvacrol y el timol actúan como moduladores alostéricos positivos del receptor 5-HT<sub>3A</sub>HC humano, y que el efecto potenciador es evidente a concentraciones menores que el efecto agonista.

### 3. ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> POR AGONISTAS ORTOSTÉRICOS A NIVEL DE CANAL ÚNICO

Una vez caracterizada la activación del 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> a nivel macroscópico, se realizaron registros en la configuración *cell-attached* para descifrar a nivel de canal único su forma de activación.

Para todas las concentraciones de 5-HT evaluadas (1-30  $\mu\text{M}$ ) la activación se produjo en forma de eventos de apertura de  $4,5 \pm 0,4$  pA (a -70 mV de potencial de membrana) formando *bursts* de alta probabilidad de apertura que se agruparon en episodios de activación más largos denominados *clusters* (Figura 3). A 1  $\mu\text{M}$  de 5-HT se observaron *clusters* de aproximadamente 290 ms con una alta probabilidad de apertura ( $\sim 0,94$ ) (Figura 3 y Tabla 1). Los histogramas de estado abierto se describieron correctamente con 3 componentes, cuyas duraciones fueron de  $\sim 0,05$  ms,  $\sim 0,40$  ms y  $\sim 23$  ms (Figura 3 y Tabla 1). Con el aumento de la concentración de 5-HT se observó una clara reducción de la duración del componente más lento, probablemente debido a un bloqueo del canal, tal como se describió anteriormente para el 5-HT<sub>3A</sub> de ratón (Corradi *et al.*, 2009). Para describir este efecto se utilizó el esquema de bloqueo de canal abierto (Neher y Steinbach, 1978, ver capítulo 1, página 134) y se obtuvo un valor de  $k_{+B}$  de  $5,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $R^2=0,98$ ), similar a lo observado con el receptor 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> de ratón (Corradi *et al.*, 2009). Los histogramas de estado cerrado mostraron 5 o 6 componentes, los 3 más breves corresponden a cierres dentro de los *clusters* (Figura 3 y Tabla 1). Los valores de estos cierres permanecieron constantes para todas las concentraciones, indicando que no existe dependencia de la concentración del agonista en el perfil de activación de este receptor (Figura 3 y Tabla 1).

La activación por triptamina (10-100  $\mu\text{M}$ ) se produjo en forma de *bursts* breves (50 ms) sin formación de *clusters* (Figura 3 y Tabla 1). Los histogramas de estado abierto fueron descritos con 2 componentes, siendo la duración del componente más largo de aproximadamente 6 ms (Tabla 1). Al igual que con 5-HT, se observó una disminución de la duración del componente de estado abierto de mayor duración con el aumento de la concentración de triptamina, lo que sugiere que actúa como bloqueador de canal. El valor de  $k_{+B}$  obtenido fue de  $4,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $R^2=0,98$ ), similar a lo observado con 5-HT. Los histogramas de estado cerrado mostraron 4 o 5 componentes.



**Figura 3.** Registros de canal único del receptor  $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$  obtenidos con 5-HT, triptamina, carvacrol o timol a baja (arriba) y alta (abajo) resolución. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

Ligando	[ $\mu$ M]	O <sub>1</sub> (área rel)	Burst (P <sub>open</sub> )	Cluster (P <sub>open</sub> )	n
<b>5-HT</b>					
	1	23 ± 6 (0,49 ± 0,19)	136 ± 54 (0,99 ± 0,01)	287 ± 123 (0,94 ± 0,05)	13
	5	13 ± 4 (0,57 ± 0,08)	90 ± 34 (0,99 ± 0,01)	221 ± 83 (0,91 ± 0,04)	5
	10	8,8 ± 2,4 (0,58 ± 0,09)	94 ± 53 (0,98 ± 0,01)	246 ± 131 (0,89 ± 0,04)	4
	30	4,8 ± 0,6 (0,51 ± 0,05)	38 ± 10 (0,97 ± 0,01)	98 ± 50 (0,78 ± 0,07)	10
<b>Triptamina</b>					
	10	6,9 ± 1,0 (0,67 ± 0,28)	29 ± 17 (0,99 ± 0,01)		3
	20	5,4 ± 2,6 (0,80 ± 0,23)	62 ± 33 (0,99 ± 0,01)		3
	50	3,2 ± 1,2 (0,75 ± 0,12)	26 ± 10 (0,99 ± 0,01)		10
	100	1,7 ± 0,1 (0,82 ± 0,17)	30 ± 9 (0,98 ± 0,01)		5
<b>Carvacrol</b>					
	5	25 ± 5 (0,59 ± 0,27)		2542 ± 998 (0,94 ± 0,02)	3
	10	38 ± 11 (0,47 ± 0,20)		1734 ± 910 (0,98 ± 0,02)	8
	20	31 ± 17 (0,66 ± 0,09)		3615 ± 1,563 (0,96 ± 0,02)	4
	50	31 ± 12 (0,44 ± 0,16)		1013 ± 367 (0,99 ± 0,01)	4
<b>Timol</b>					
	5	34 ± 8 (0,58 ± 0,22)		1539 ± 771 (0,99 ± 0,01)	4
	10	17 ± 2 (0,27 ± 0,19)		1226 ± 459 (0,97 ± 0,02)	3
	20	34 ± 14 (0,32 ± 0,14)		1761 ± 495 (0,98 ± 0,01)	5

	50	45 ± 12 (0,32 ± 0,12)	1215 ± 184 (0,97 ± 0,01)	3
	100	39 ± 15 (0,54 ± 0,13)	1581 ± 803 (0,98 ± 0,01)	6
<b>Triptamina Carvacrol</b>				
	50	4,4 ± 1,1	1861 ± 890	6
	10	(0,83 ± 0,11)	(0,96 ± 0,02)	
<b>Triptamina Timol</b>				
	50	2,7 ± 0,1	560 ± 445	3
	10	(0,72 ± 0,04)	(0,94 ± 0,02)	

**Tabla 1.** Parámetros de canal único de los receptores 5-HT<sub>3AHC</sub>. “O<sub>1</sub>” corresponde a la duración del componente más largo de estado abierto. “n” corresponde al número de réplicas independientes para cada condición.

En conclusión, las principales diferencias observadas en la activación con triptamina respecto a lo observado con 5-HT fueron una menor duración de los tiempos de estado abierto y la ausencia de *clusters* de larga duración, las que evidencian el carácter de agonista parcial de la triptamina.

#### 4. ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>3AHC</sub> POR CARVACROL Y TIMOL A NIVEL DE CANAL ÚNICO

Para estudiar el patrón de activación del receptor 5-HT<sub>3AHC</sub> por los terpenoides carvacrol y timol, se obtuvieron registros de canal único en presencia de estos compuestos.

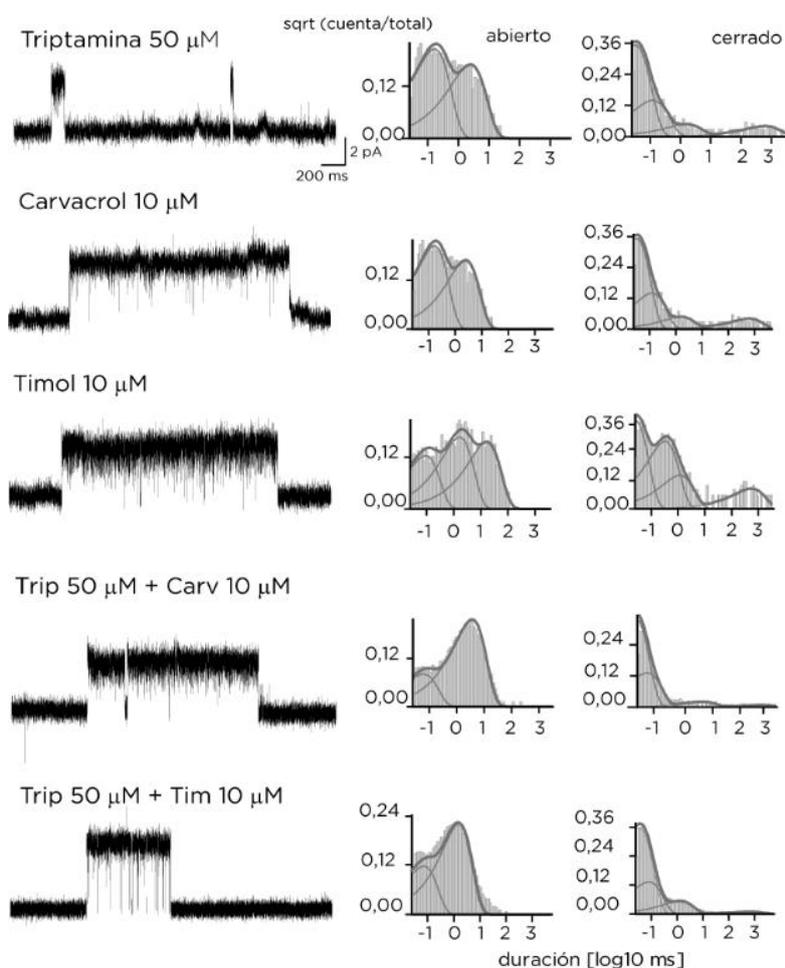
En presencia de distintas concentraciones de carvacrol (5-50 μM) o timol (5-100 μM) y en ausencia de 5-HT, se observaron eventos de aperturas agrupados en *clusters* de larga duración, similares a los obtenidos con 5-HT (Figura 3). Los histogramas de estado abierto mostraron 2 o 3 componentes, sin observarse una dependencia de la concentración (Figura 3 y Tabla 1). A 5 μM, las duraciones medias del componente de apertura más largo fueron de ~ 25 ms para carvacrol y ~ 34 ms para timol, similar a lo observado con 5-HT. Los histogramas de estado cerrado se describieron con 5 o 6 componentes, donde los 3 más

breves corresponden a cierres dentro del *cluster* (Figura 3). Los *clusters* obtenidos en estas condiciones fueron entre 6 y 10 veces más largos que los obtenidos con 5-HT (~ 2500 ms y ~ 1500 ms a 5  $\mu$ M de carvacrol y timol, respectivamente) (Figura 3 y Tabla 1).

Es decir que, a pesar de que los perfiles de corrientes macroscópicas mostraron que el carvacrol y el timol se comportan como agonistas parciales del receptor 5-HT<sub>3A</sub> humano, los registros de canal único indican una activación más parecida a la activación por 5-HT que a la producida por un agonista ortostérico parcial como la triptamina. En presencia de estos agonistas alostéricos, los receptores se activan en forma de *clusters* de larga duración y alta probabilidad de apertura, muy diferente a lo que ocurre con triptamina. Por otro lado, las duraciones de los *clusters* son mayores a las obtenidas con 5-HT, indicando esto una mayor eficacia.

## 5. POTENCIACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> HUMANO POR CARVACROL Y TIMOL A NIVEL DE CANAL ÚNICO

Para evaluar la potenciación del receptor por carvacrol y timol se registraron eventos de canal único con 50  $\mu$ M de triptamina en presencia de 10  $\mu$ M de los compuestos terpenoides (Figura 4). Se eligió realizar los registros con triptamina, dado que hipotetizamos que un cambio en la duración de los periodos de activación debido a una modulación positiva sería más fácilmente detectable en los *bursts* obtenidos con triptamina que en los *clusters* de larga duración obtenidos con 5-HT. Los registros mostraron *clusters* de larga duración y alta probabilidad de apertura, cuyos valores fueron similares a los obtenidos en presencia de los agonistas alostéricos en ausencia de triptamina (Figura 4 y Tabla 1). Sin embargo, para ambas condiciones (triptamina + carvacrol y triptamina + timol) los histogramas de estado abierto mostraron el mismo número de componentes y de similar duración a los obtenidos en presencia de triptamina sola (Figura 4 y Tabla 1).



**Figura 4.** Trazos representativos de registros de canal único del receptor  $5\text{-HT}_3\text{A}_{\text{HC}}$  obtenidos con triptamina, carvacrol, timol o la aplicación de triptamina + carvacrol o triptamina + timol. Los registros fueron obtenidos en la configuración *cell-attached* a  $-70$  mV de potencial de membrana. A la derecha se muestran los respectivos histogramas de estado abierto y cerrado.

La razón de por qué se observa este perfil mixto, el cual muestra aperturas breves como las originadas por triptamina y *clusters* de larga duración como los observados con carvacrol o timol solos, aún no está clara. Una posible explicación es que la duración de las aperturas sea regida por el agonista ortostérico (triptamina), y la duración de los *clusters* por el agonista alostérico (carvacrol o timol). Alternativamente, la reducción de las aperturas originadas por carvacrol o timol podría ser explicada como un bloqueo del canal producido por la triptamina.

## DISCUSIÓN

En este capítulo de este trabajo de Tesis se describió la activación a nivel de canal único del receptor homomérico 5-HT<sub>3</sub>A humano generada por la acción de ligandos ortostéricos y alostéricos.

El hecho de que los receptores *Cys-loop* sean blancos importantes para diferentes fármacos destinados al tratamiento de un gran número de enfermedades o desórdenes ha atraído la atención hacia los mecanismos por los cuales estos fármacos actúan. La modulación farmacológica puede ocurrir tanto en sitios ortostéricos como alostéricos, resultando esto en un amplio espectro de estructuras químicas, sitios y mecanismos de modulación. En particular, los ligandos alostéricos han surgido como herramientas terapéuticas valiosas debido a que modifican las respuestas de los receptores sin alterar los patrones temporales y espaciales de su activación endógena (Uteshev, 2014; Chatzidaki y Millar, 2015; Bouzat *et al.*, 2018).

Estudios electrofisiológicos y estructurales han permitido obtener información sobre distintos mecanismos de activación desde sitios ortostéricos (Solt *et al.*, 2007; Corradi *et al.*, 2011; Sauguet *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2017; Bouzat y Sine, 2018). Sin embargo, los mecanismos de activación alostérica de los receptores 5-HT<sub>3</sub> han sido menos estudiados y aún no se conocen en su totalidad.

En esta sección de este trabajo de Tesis, primeramente, se caracterizó la activación del receptor humano 5-HT<sub>3A<sub>HC</sub></sub> a nivel de canal único por los agonistas ortostéricos 5-HT y triptamina, y, luego, la activación alostérica mediada por terpenoides. Los terpenoides son compuestos fenólicos monocíclicos presentes en los aceites esenciales de plantas aromáticas usadas en la medicina tradicional (Tsuchiya, 2017; Hernando *et al.*, 2019). A nivel molecular, se ha demostrado que ejercen múltiples efectos en toda la familia de receptores *Cys-loop*, tanto en vertebrados como en invertebrados, tales como activación, potenciación e inhibición (Price y Lummis, 2014; Lozon *et al.*, 2016; Hernando *et al.*, 2019). En los receptores 5-HT<sub>3A</sub>, los terpenoides actúan como ago-PAMs y/o como inhibidores. En particular, estudios de corrientes macroscópicas han demostrado que el carvacrol y el timol actúan como agonistas parciales y potenciadores de los receptores 5-HT<sub>3A</sub> (Lansdell, 2015). Estudios de *docking* molecular y mutaciones puntuales demostraron que la activación por estos compuestos ocurre de forma alostérica a través de una cavidad que se encuentra entre las hélices TM1 y TM2 de una subunidad y las hélices TM3 y TM4 de la subunidad adyacente (Lansdell, 2015; Price *et al.*, 2017). Los registros de canal único demostraron que, al igual que lo reportado para el receptor 5-HT<sub>3A</sub> de ratón, el receptor

5-HT<sub>3A</sub> humano se activa en eventos de apertura sucesivos que forman *bursts* y que, a su vez, se asocian para formar *clusters*. Cada *cluster* corresponde a la activación de una molécula única de receptor que oscila entre distintos estados abiertos y cerrados hasta finalizar por desensibilización.

Por otro lado, la activación por el agonista parcial triptamina generó eventos de apertura más breves que los obtenidos con 5-HT y, si bien aparecieron formando *bursts* de alta probabilidad de apertura, no se detectaron *clusters*. Estos resultados describen la baja eficacia de la triptamina como activador del receptor humano.

Inicialmente se reportó que tanto el carvacrol como el timol se comportan como agonistas parciales del receptor 5-HT<sub>3A</sub> humano. Sin embargo, valiéndonos de nuestro modelo de alta conductancia, determinamos que estos dos terpenoides activan a los receptores 5-HT<sub>3A</sub> humano con una alta eficacia, lo que se evidencia por una mayor duración de los *clusters*.

Se analizaron posibles explicaciones para la aparente discrepancia entre lo observado a nivel macroscópico (ambos terpenoides actúan como agonistas parciales al generar respuestas máximas menores a las obtenidas con 5-HT) y lo observado a nivel microscópico (los eventos de canales unitarios se observan en forma de largos *clusters* de alta probabilidad de apertura). Es sabido que un bloqueo del canal producido por altas concentraciones del agonista podría reducir las respuestas macroscópicas (Corradi *et al.*, 2014). Sin embargo, a partir de los registros de canales unitarios no se detectó una reducción en los tiempos de estado abierto, en la duración de los *clusters* o en la probabilidad de apertura a concentraciones altas de timol o de carvacrol, lo que confirma que no se produjo un bloqueo del canal.

Otra posibilidad planteada fue la existencia de un paso de preactivación lento, el cual limitaría la respuesta máxima del canal (Corradi y Bouzat, 2014). Las velocidades de transición pueden ser determinadas realizando análisis cinético a partir de los registros de canal único obtenidos. El estudio cinético realizado utilizando los datos de canal único del receptor 5-HT<sub>3AHC</sub> activado por los distintos ligandos determinó que la activación alostérica de este receptor puede describirse mediante el mismo mecanismo cinético que el utilizado para 5-HT. Más aún, el primer paso de transición, luego de alcanzado el estado de ocupación óptima del agonista, y el cual corresponde a la formación del estado preactivado, fue similar para los ligandos alostéricos y para 5-HT. En cambio, en presencia de triptamina este primer paso de preactivación fue más lento que el observado con 5-HT, lo que confirma su acción como agonista parcial. Por lo tanto, el análisis cinético permitió concluir que la menor eficacia de estos ligandos alostéricos observada a partir de las

corrientes macroscópicas debe tener un origen diferente al de los agonistas ortostéricos parciales.

Otra posible explicación para esta discrepancia entre el comportamiento del carvacrol y el timol a nivel macroscópico con respecto a lo observado a nivel microscópico sería su accesibilidad a los sitios de unión a través de la membrana plasmática. Estudios experimentales y computacionales mostraron que el timol se incorpora a la membrana lipídica de manera saturante (Turina *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2016), lo que podría reducir la concentración efectiva y limitaría la saturación de los sitios de unión. Más aún, el número de sitios alostéricos requeridos para la activación del receptor podría ser diferente del número de sitios requeridos por agonistas ortostéricos. Por ejemplo, en los receptores GABA se reportó que se requiere la ocupación de solo dos sitios ortostéricos para su máxima activación, mientras que, para ligandos alostéricos, se necesita la ocupación de cinco sitios (Amin y Subbarayan, 2017). Por lo tanto, la limitación en la saturación de los sitios alostéricos debido a la concentración alcanzable de estos compuestos en la membrana es otra posible explicación para la respuesta parcial observada a nivel macroscópico.

Como conclusión, en este capítulo de este trabajo de Tesis se pudieron descifrar por primera vez las diferencias entre activación ortostérica y alostérica en uno de los receptores menos explorados de la familia *Cys-loop*, el receptor de serotonina 5-HT<sub>3A</sub>, blanco molecular poco estudiado para la EA.

# **CONCLUSIONES GENERALES**

En este trabajo de Tesis se abordó el estudio de la función y modulación de dos receptores de neurotransmisores pertenecientes a la familia *Cys-loop*: los nAChRs, muscular y  $\alpha 7$  neuronal, y los receptores 5-HT<sub>3</sub>. Dado que se encuentran involucrados en distintas patologías neurodegenerativas, estos receptores se consideran blancos moleculares importantes para el desarrollo de fármacos, y es por esto que el conocimiento de su función y modulación es crucial.

El nAChR es una proteína transmembrana cuya función está condicionada por estímulos tanto externos como propios de la membrana celular. Dado que la señal colinérgica se encuentra afectada en varias patologías neurodegenerativas, como la EA, gran parte de este trabajo de Tesis se centró en el estudio de la modulación de dicha señal a diferentes niveles. En el **capítulo I** se estudió la modulación del nAChR muscular por el entorno lipídico de la membrana en la que se encuentra. Se focalizó especialmente en el Col, lípido clave para el correcto funcionamiento del nAChR y que presenta distintas asimetrías laterales y transmembrana en diferentes momentos de la vida y en condiciones de salud o enfermedad. Dada la importancia del Col en la formación de los dominios Lo, se pudo descifrar la implicancia de los mismos, y por lo tanto del Col, en la funcionalidad del nAChR. Si bien el nAChR tiene la potencialidad de localizarse tanto en dominios Lo como Ld, la localización del mismo en dominios Lo ocasiona una disminución de su actividad, mientras que su presencia en dominios Ld lleva a un aumento de su función. Los lípidos anulares, en estrecho contacto con el nAChR, serían los responsables de que ocurran los cambios conformacionales asociados al gatillado del receptor, y, por lo tanto, la localización del nAChR en un determinado entorno repercutiría directamente en su funcionalidad. Estos resultados dan una explicación al hecho ya conocido de la alta dependencia del nAChR por los lípidos de su entorno e informan de la importancia de los mismos en las distintas patologías en las que está involucrado. De esta manera, su localización en uno u otro dominio podría explicar los cambios en la señal colinérgica observados en situaciones de envejecimiento y/o patologías como la EA.

Una de las características principales y distintivas de la EA es la presencia exacerbada de péptido A $\beta$ , al que se le atribuyen múltiples roles en la fisiopatología de dicha enfermedad, tal como se discutió en la Introducción de este trabajo de Tesis. Al mismo tiempo, en la EA hay una marcada pérdida de la función colinérgica también explicada por más de una causa, una de las cuales fue desarrollada en el capítulo I de este trabajo. En el **capítulo II** se estudió la relación del nAChR  $\alpha 7$  neuronal con los oligómeros de A $\beta$  desde un punto de vista conformacional y funcional. Concentraciones bajas de oligómeros de A $\beta$ , similares a las que se encuentran en condiciones fisiológicas en

humanos, activan al nAChR  $\alpha 7$  neuronal y podrían por lo tanto tener un rol beneficioso. Concentraciones altas de estos oligómeros, compatibles con las encontradas en pacientes con EA, inhiben a dicho receptor, lo que podría estar relacionado con la deficiencia en la memoria y cognición que se observa en dicha enfermedad. Es decir, desde una perspectiva molecular, se caracterizó la acción de los oligómeros de A $\beta$  a nivel celular, resultados altamente significativos en la comprensión de uno de los múltiples efectos que ocasionan los oligómeros de A $\beta$  en la EA.

El hecho de que el nAChR sea una proteína íntimamente involucrada en la EA lo transforma en un blanco molecular sumamente interesante para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de esta patología. Además, considerando las características multifactoriales de la EA, la estrategia de búsqueda de nuevas moléculas apunta al descubrimiento y desarrollo de “*multitarget drugs*”, es decir de moléculas activas en varios blancos moleculares. El **capítulo III** se centró en el descubrimiento y optimización de nuevas moléculas bifuncionales capaces de activar al nAChR e inhibir a la ACE, y que por lo tanto permitan potenciar la transmisión colinérgica que se encuentra disminuida en la EA. Partiendo de un *screening* de extractos obtenidos de distintas plantas medicinales, se identificó a la molécula de cafeína como una molécula sumamente interesante para esta patología, ya que sumado a su ya conocida actividad inhibidora de la ACE, se describió por primera vez su actividad agonista sobre los nAChRs muscular y  $\alpha 7$  neuronal. Además, mediante diseño racional utilizando a la cafeína como molécula líder, se obtuvieron 5 análogos que presentaron actividad sobre ambos blancos moleculares, la ACE y los nAChRs, con una mayor potencia que la cafeína. Estos hallazgos resultan prometedores en la búsqueda de nuevos fármacos como una posible estrategia terapéutica para la EA.

La otra molécula estudiada en este trabajo de Tesis fue el receptor 5-HT $_3$ , proteína transmembrana que en el último tiempo se ha postulada como un blanco molecular novedoso tanto en la EA como en otras patologías neurodegenerativas que requieran una potenciación de la señal colinérgica. Sin embargo, es uno de los receptores de serotonina más recientemente descrito y uno de los menos estudiados dentro de los *Cys-loop*. En el **capítulo IV**, utilizando el receptor de alta conductancia 5-HT $_3$ AHC, se descifraron por primera vez las diferencias entre la activación ortostérica del mismo y su activación alostérica por timol y carvacrol. Dado que se han encontrado ciertos antagonistas del receptor 5-HT $_3$  que mejoran los síntomas de la EA (Werner y Covenas, 2016) y otros que potencian la inhibición de la ACE (Skovgard *et al.*, 2018), estos resultados constituyen un primer paso en la descripción mecanística de un nuevo blanco molecular poco estudiado en la EA.

Por lo tanto, en este trabajo de Tesis se profundizó en el conocimiento de distintas formas de modulación de los nAChRs y del receptor 5-HT<sub>3</sub>, ya sea por moléculas exógenas o por el entorno lipídico en el que se encuentran, brindando bases moleculares para el entendimiento de su función, su modulación y su afección en determinadas patologías. En particular, en la EA se encuentra fuertemente afectada la actividad colinérgica que involucra tanto a los nAChRs y a la ACE como a los recientemente descritos 5-HT<sub>3</sub>. En esta Tesis se lograron avances significativos, con resultados de gran relevancia, para el estudio o tratamiento de esta enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Rodríguez J, Ledesma MD, Craessaerts K, Perga S, Medina M, Delacourte A, Dingwall C, De Strooper B, Dotti CG. (2004). Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol.* 167: 953-960.
- Absalom NL, Schofield PR, Lewis TM. (2009). Pore structure of the Cys-loop ligand-gated ion channels. *Neurochem Res.* 34: 1805-1815.
- Addona GH, Sandermann H Jr, Kloczewiak MA, Husain SS, Miller KW. (1998). Where does cholesterol act during activation of the nicotinic acetylcholine receptor? *Biochim Biophys Acta.* 1370: 299-309.
- Addona GH, Sandermann H Jr, Kloczewiak MA, Miller KW. (2003). Low chemical specificity of the nicotinic acetylcholine receptor sterol activation site. *Biochim Biophys Acta.* 1609: 177-182.
- Ahmed F, Ghalib RM, Sasikala P, Ahimed KKM. (2013). Cholinesterase inhibitors from botanicals. *Pharmacogn Rev.* 7: 121-130.
- Ahn KW, Sampson NS. (2004). Cholesterol oxidase senses subtle changes in lipid bilayer structure. *Biochemistry.* 43: 827-836.
- Akk G. (2005). Galantamine activates muscle-type nicotinic acetylcholine receptors without binding to the acetylcholine-binding site. *J Neurosci.* 25: 1992-2001.
- Akk G, Steinbach JH. (2005). Galantamine activates muscle-type nicotinic acetylcholine receptors without binding to the acetylcholine-binding site. *J Neurosci.* 25: 1992-2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:2375-2377.
- Al Kury LT, Mahgoub M, Howarth FC, Oz M. (2018). Natural Negative Allosteric Modulators of 5-HT<sub>3</sub> Receptors. *Molecules.* 23: 3186.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 89: 73-120.
- Almarza G, Sánchez F, Barrantes FJ. (2014). Transient cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor cell-surface mobility. *PLoS One.* 9:e100346.
- Alptüzün V, Prinz M, Hörr V, Scheiber J, Radacki K, Fallarero A, Vuorela P, Engels B, Braunschweig H, Erciyas E, Holzgrabe U. (2010). Interaction of (benzylidene-hydrazono)-1,4-dihydropyridines With Beta-Amyloid, Acetylcholine, and Butyrylcholine Esterases. *Bioorg Med Chem.* 18: 2049-2059.
- al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol.* 37: 124-130.
- Amin J, Subbarayan MS. (2017). Orthosteric- versus allosteric-dependent activation of the GABAA receptor requires numerically distinct subunit level rearrangements. *Sci Rep.* 7: 7770.
- Andersen N, Corradi J, Sine SM, y Bouzat C. (2013). Stoichiometry for activation of neuronal  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110: 20819-20824.
- Andreasen N, Sjögren M, Blennow K. (2003). CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42. *World J Biol Psychiatry.* 4: 147-155.
- Antollini SS, Soto MA, Bonini de Romanelli I, Gutiérrez-Merino C, Sotomayor P, Barrantes FJ. (1996). Physical state of bulk and protein-associated lipid in nicotinic acetylcholine receptor-rich membrane studied by laurdan generalized polarization and fluorescence energy transfer. *Biophys J.* 70: 1275-1284.
- Antollini SS, Barrantes FJ. (1998). Disclosure of discrete sites for phospholipid and sterols at the protein-lipid interface in native acetylcholine receptor-rich membrane. *Biochemistry.* 37: 16653-16662.
- Antollini SS, Xu Y, Jiang H, Barrantes FJ. (2005). Fluorescence and molecular dynamics studies of the acetylcholine receptor gammaM4 transmembrane peptide in reconstituted systems. *Mol Membr Biol.* 22: 471-483.
- Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR, Shippy D, Tan J. (2006). Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience.* 142: 941-952.
- Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, Rezai-Zadeh K, Tane J, Citron BA, Lin X, Echeverria V, Potter H. (2009). Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *J Alzheimers Dis.* 17: 661-680.
- Arias HR, Bhumireddy P, Bouzat C. (2006). Molecular mechanisms and binding site

- locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 38: 1254-1276.
- Arispe N, Pollard HB, Rojas E. (1993). Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 10573-10577.
- Arispe N, Rojas, E., and Pollard, H. B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 567-571.
- Ashoor A, Nordman JC, Veltri D, Yang KH, Shuba Y, Al Kury L, Sadek B, Howarth FC, Shehu A, Kabbani N, Oz M. (2013). Menthol inhibits 5-HT3 receptor-mediated currents. *J Pharmacol Exp Ther.* 347: 398-409.
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM, Stuppner H. (2015). Discovery and Resupply of Pharmacologically Active Plant-Derived Natural Products: A Review. *Biotechnol Adv.* 33: 1582-1614.
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. (2002). Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol.* 68: 209-245.
- Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Warden CS, Vassiliev AV, Wood WG. (1997). Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids. *J Neurochem.* 69: 1746-1752.
- Baenziger JE, Domville JA, Therien JPD. (2017). The Role of Cholesterol in the Activation of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Top Membr.* 80: 95-137.
- Baenziger JE, Hénault CM, Therien JP, Sun J. (2015). Nicotinic acetylcholine receptor-lipid interactions: Mechanistic insight and biological function. *Biochim Biophys Acta.* 1848: 1806-1817.
- Baenziger JE, Morris ML, Darsaut TE, Ryan SE. (2000). Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 275: 777-784.
- Báez-Pagán CA, Del Hoyo-Rivera N, Quesada O, Otero-Cruz JD, Lasalde-Dominicci JA. (2016). Heterogeneous Inhibition in Macroscopic Current Responses of Four Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes by Cholesterol Enrichment. *J Membr Biol.* 249: 539-549.
- Baier CJ, Fantini J, Barrantes FJ. (2011). Disclosure of cholesterol recognition motifs in transmembrane domains of the human nicotinic acetylcholine receptor. *Sci Rep.* 1:69.
- Baier CJ, Barrantes FJ. (2007). Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J Neurochem.* 101: 1072-1084.
- Banerjee C, Nyengaard JR, Wevers A, de Vos RA, Jansen Steur EN, Lindstrom J, Pilz K, Nowacki S, Bloch W, Schröder H. (2000). Cellular expression of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor protein in the temporal cortex in Alzheimer's and Parkinson's disease--a stereological approach. *Neurobiol Dis.* 7: 666-672.
- Baptista-Hon DT, Deeb TZ, Othman NA, Sharp D, Hales TG. (2012). The 5-HT3B subunit affects high-potency inhibition of 5-HT3 receptors by morphine. *Br J Pharmacol.* 165: 693-704.
- Barann M, Dilger JP, Bönisch H, Göthert M, Dybek A, Urban BW. (2000). Inhibition of 5-HT3 receptors by propofol: equilibrium and kinetic measurements. *Neuropharmacology.* 39: 1064-1074.
- Barnes NM, Sharp T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38: 1083-1152.
- Barrantes FJ. (2003). Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 6: 620-632.
- Barrantes FJ. (2004). Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain Res Brain Res Rev.* 47: 71-95.
- Barrantes FJ. (2007). Cholesterol effects on nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurochem.* 103: 72-80.
- Barrantes FJ, Bermudez V, Borroni MV, Antollini SS, Pediconi MF, Baier JC, Bonini I, Gallegos C, Roccamo AM, Valles AS, Ayala V, Kamerbeek C. (2010). Boundary Lipids In The Nicotinic Acetylcholine Receptor Microenvironment. *J Mol Neurosci.* 40: 87-90.
- Barshtein B, Bergelson L, Dagan A, Gratton E, Yedgar S. (1997). Membrane lipid order of human red blood cells is altered by physiological levels of hydrostatic pressure. *Am J Physiol.* 272: 38-43.

- Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, Andrisano V. (2003). Beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol.* 65: 407-416.
- Bartos M, Corradi J, Bouzat C. (2009). Structural basis of activation of cys-loop receptors: the extracellular-transmembrane interface as a coupling region. *Mol Neurobiol.* 40: 236-252.
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lipka AS. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction *Science.* 217: 408-414.
- Baumgart T, Sengupta P, Hess ST, Holowka DA, Baird BA, Webb WW. (2007). Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 3165-3170.
- Beel AJ, Sakakura M, Barrett PJ, Sanders CR. (2010). Direct binding of cholesterol to the amyloid precursor protein: An important interaction in lipid Alzheimer's disease relationships? *Biochim Biophys Acta.* 1801: 975-982.
- Beers WH, Reich E. (1970). Structure and activity of acetylcholine. *Nature.* 228: 917-922.
- Bermúdez V, Antollini SS, Fernández Nieves GA, Avelaño MI, Barrantes FJ. (2010). Partition profile of the nicotinic acetylcholine receptor in lipid domains upon reconstitution. *J Lipid Res.* 51: 2629-2641.
- Bhatia T, Husen P, Brewer J, Bagatolli LA, Hansen PL, Ipsen JH, Mouritsen OG. (2015). Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipid mixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures. *Biochim Biophys Acta.* 1848: 3175-3180.
- Billen B, Spurny R, Brams M, Elk R, Valera-Kummer S, Yakel JL, Voets T, Bertrand D, Smit AB, Ulens C. (2012). Molecular actions of smoking cessation drugs at  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 9173-9178.
- Björkbohm A, Róg T, Kankaanpää P, Lindroos D, Kaszuba K, Kurita M, Yamaguchi S, Yamamoto T, Jaikishan S, Paavolainen L, Päivärinne J, Nyholm TK, Katsumura S, Vattulainen I, Slotte JP. (2011). N- and O-methylation of sphingomyelin markedly affects its membrane properties and interactions with cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1808: 1179-1186.
- Blum A, Lester HA, and Dougherty DA. (2010). Nicotinic pharmacophore: The pyridine N of nicotine and carbonyl of acetylcholine hydrogen bond across a subunit interface to a backbone NH. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 13206-13211.
- Bonini IC, Antollini SS, Gutiérrez-Merino C, Barrantes FJ. (2002). Sphingomyelin composition and physical asymmetries in native acetylcholine receptor-rich membranes. *Eur Biophys J.* 31: 417-27.
- Borroni V, Baier CJ, Lang T, Bonini I, White MM, Garbus I, Barrantes FJ. (2007). Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane. *Mol Membr Biol.* 24: 1-15.
- Borroni V, Barrantes FJ. (2011). Cholesterol modulates the rate and mechanism of acetylcholine receptor internalization. *J Biol Chem.* 286: 17122-17132.
- Bouzat C, Bren N, Sine SM. (1994). Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron.* 13: 1395-1402.
- Bouzat C, Roccamo AM, Garbus I, Barrantes FJ. (1998). Mutations at lipid-exposed residues of the acetylcholine receptor affect its gating kinetics. *Mol Pharmacol.* 54:146-153.
- Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang HL, Rayes D, Hansen SB, Taylor P, 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. (2012). New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *J Physiol Paris.* 106:23-33.
- Bouzat C, Barrantes F, Sine S. (2000). Nicotinic receptor fourth transmembrane domain: hydrogen bonding by conserved threonine contributes to channel gating kinetics. *J Gen Physiol.* 115: 663-672.
- Bouzat C, Bartos M, Corradi J, 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, Lasala M, Nielsen BE, Corradi J, Esandi MDC. (2017). Molecular function of  $\alpha 7$  nicotinic receptors as drug targets. *J Physiol.* 596:1847-1861.
- Bouzat C, Mukhtasimova N. (2018). The nicotinic acetylcholine receptor as a molecular machine for neuromuscular transmission. *Curr Opin Physiol.* 4: 40-48.

- Bouzat C, Sine SM. (2018). Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level. *Br J Pharmacol.* 175: 1789-1804.
- Bown D. (1995). *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*. Editorial Dorling Kindersley, London. ISBN 0-7513-020-31.
- Brady CA, Stanford IM, Ali I, Lin L, Williams JM, Dubin AE, Hope AG, Barnes NM. (2001). Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT<sub>3A</sub> receptors versus heteromeric 5-HT<sub>3A/3B</sub> receptors. *Neuropharmacology.* 41: 282-284.
- Branduardi D, Gervasio FL, Cavalli A, Recanatini M, Parrinello M. (2005). The role of the peripheral anionic site and cation- $\pi$  interactions in the ligand penetration of the human AChE gorge. *J Am Chem Soc.* 127: 9147-9155.
- Brannigan G, Hénin J, Law R, Eckenhoff R, Klein ML. (2008). Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 14418-14423.
- Brannigan G. (2017). Direct Interactions of Cholesterol With Pentameric Ligand-Gated Ion Channels: Testable Hypotheses From Computational Predictions. *Curr Top Membr.* 80: 163-186.
- Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature.* 441: 269-276.
- Briley MS, Changeux JP. (1978). Recovery of some functional properties of the detergent-extracted cholinergic receptor protein from Torpedo marmorata after reintegration into a membrane environment. *Eur J Biochem.* 84: 429-439.
- Brockhausen J, Cole RN, Gervásio OL, Ngo ST, Noakes PG, Phillips WD. (2008). Neural agrin increases postsynaptic ACh receptor packing by elevating rapsyn protein at the mouse neuromuscular synapse. *Dev Neurobiol.* 68: 1153-1169.
- Broide RS, Leslie FM. (1999). The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol.* 20: 1-16.
- Bruhova I, Auerbach A. (2017). Molecular recognition at cholinergic synapses: acetylcholine versus choline. *J Physiol.* 15: 1253-1261.
- Brusés JL, Chauvet N, Rutishauser U. (2001). Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J Neurosci.* 21: 504-512.
- Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, y Sattelle DB. (2009). Nicotinic Acetylcholine Receptor Signalling: Roles in Alzheimer's Disease and Amyloid Neuroprotection. *Pharmacol Rev.* 61: 39-61.
- Burger M, Seidel K. Z. (1958). Chemical biomorphosis of the human brain and sciatic nerve; a survey. *Alternsforsch.* 12: 52-79.
- Burns M, Duff K. Cholesterol in Alzheimer's disease and tauopathy. *Ann NY Acad Sci.* 977: 367-375.
- Butterfield DA, Boyd-Kimball D. (2005). The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1703: 149-156.
- Caballero-Rivera D, Cruz-Nieves OA, Oyola-Cintrón J, Torres-Nunez DA, Otero-Cruz JD, Lasalde-Dominicci JA. (2012). Tryptophan scanning mutagenesis reveals distortions in the helical structure of the  $\delta M4$  transmembrane domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *Channels (Austin).* 6: 111-123.
- Campagna JA, Fallon J. (2006). Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience.* 138: 123-132.
- Campanari ML, García-Ayllón MS, Belbin O, Galcerán J, Lleó A, Sáez-Valero J. (2014). Acetylcholinesterase modulates presenilin-1 levels and g-secretase activity. *J. Alzheimers Dis.* 41: 911-924.
- Cappelletti S, Daria P, Sani G, Aromatario M. (2015). Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug?. *Curr Neuropharmacol.* 13: 71-88.
- Cartaud A, Stetzkowski-Marden F, Maoui A, Cartaud J. (2011). Agrin triggers the clustering of raft-associated acetylcholine receptors through actin cytoskeleton reorganization. *Biol Cell.* 103:287-301.
- Ceccarelli B, Hurlbut WP. (1980). Ca<sup>2+</sup>-dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol.* 87: 297-303.
- Cederbaum AI, Kukielka E, Speisky H. (1992). Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine. *Biochem Pharmacol.* 44: 1765-1772.
- Chakrapani S, Auerbach A. (2004). A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 87-92.

- Chan EW, Soh EY, Tie PP, Law YP. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Res.* 3: 266-272.
- Chang YC, Wu W, Zhang JL, Huang Y. (2009). Allosteric activation mechanism of the cys-loop receptors. *Acta Pharmacol Sin.* 30: 663-672.
- Chatzidaki A, Millar NS. (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol.* 97: 408-417.
- Chatzidaki A, Millar NS. (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol.* 97:408-417.
- Chen X, Wolfgang DE, Sampson NS. (2000). Use of the parallax-quench method to determine the position of the active-site loop of cholesterol oxidase in lipid bilayers. *Biochemistry.* 39: 13383-13389.
- Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EB, Love J, Franklin MC, Height JJ. (2012). Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J Med Chem.* 55: 10282-10286.
- Cheung S, Tai J. (2007). Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol Rep.* 17:1525-1531.
- Chong PL, Zhu W, Venegas B. (2009). On the lateral structure of model membranes containing cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1788: 2-11.
- Christopher G, Sutherland D, Smith A. (2005). Effects of caffeine in non-withdrawn volunteers. *Hum. Psychopharmacol.* 20: 47-53.
- Chuliá S, Moreau J, Naline E, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocón MP, Advenier C. (1996). The effect of S-(+)-boldine on the alpha 1-adrenoceptor of the guinea-pig aorta. *Br J Pharmacol.* 119: 1305-1312.
- Cohen BM, Zubenko GS. (1985). Aging and the biophysical properties of cell membranes. *Life Sci.* 37: 1403-1409.
- Collins-Praino LE, Francis YI, Griffith EY, Wiegman AF, Urbach J, Lawton A, Honig LS, Cortes E, Vonsattel JPG, Canoll PD, Goldman JE, Brickman AM. (2014). Soluble amyloid beta levels are elevated in the white matter of Alzheimer's patients, independent of cortical plaque severity. *Acta Neuropathol Commun.* 2: 1-10.
- Colón-Sáez JO, Yakel JL. (2011). The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor function in hippocampal neurons is regulated by the lipid composition of the plasma membrane. *J Physiol.* 589: 3163-3174.
- Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 11: 315-335.
- Contestabile A. (2011). The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res.* 221: 334-340.
- Corbin J, Wang HH, Blanton MP. (1998). Identifying the cholesterol binding domain in the nicotinic acetylcholine receptor with [125I]azido-cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1414: 65-74.
- Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ. (2006). The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol.* 23: 111-122.
- Corradi J, Andersen N, Bouzat C. (2011). A novel mechanism of modulation of 5-HT<sub>3A</sub> receptors by hydrocortisone. *Biophys J.* 100: 42-51.
- Corradi J, Bouzat C. (2014). Unraveling mechanisms underlying partial agonism in 5-HT<sub>3A</sub> receptors. *J Neurosci.* 34: 16865-16876.
- Corradi J, Gumilar F, Bouzat C. (2009). Single-channel Kinetic Analysis for Activation and Desensitization of Homomeric 5-HT(3)A Receptors. *Biophys J.* 97: 1335-1345.
- Corradi J, Spitzmaul G, De Rosa MJ, Costabel M, Bouzat C. (2007). Role of pairwise interactions between M1 and M2 domains of the nicotinic receptor in channel gating. *Biophys J.* 92: 76-86.
- Corradi J, Thompson AJ, McGonigle I, Price KL, Bouzat C, Lummis SC. (2015). 5-HT<sub>3</sub> Receptor Brain-Type B-Subunits are Differentially Expressed in Heterologous Systems. *ACS Chem Neurosci.* 6: 1158-1164.
- Corradi J, Bouzat C. (2016). Understanding the Bases of Function and Modulation of  $\alpha 7$  Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol Pharmacol.* 90: 288-299.
- Court JA, Piggott MA, Lloyd S, Cookson N, Ballard CG, McKeith IG, Perry RH, Perry EK. (2000). Nicotine binding in human striatum: elevation in schizophrenia and reductions in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease and in relation to neuroleptic medication. *Neuroscience.* 98: 79-87.
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M. (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally

- regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron*. 5: 847-856.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. 219: 1184-1190.
- Cragg GM, Newman DJ. (2012). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. 1830: 3670-3695.
- Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 35: 1397-1409.
- Criado M, Eibl H, Barrantes FJ. (1982). Effects of lipids on acetylcholine receptor. Essential need of cholesterol for maintenance of agonist-induced state transitions in lipid vesicles. *Biochemistry*. 21: 3622-3629.
- Criado M, Eibl H, Barrantes FJ. (1984). Functional properties of the acetylcholine receptor incorporated in model lipid membranes. Differential effects of chain length and head group of phospholipids on receptor affinity states and receptor-mediated ion translocation. *J Biol Chem*. 259: 9188-9198.
- Criado M, Vaz WL, Barrantes FJ, Jovin TM. (1982). Translational diffusion of acetylcholine receptor (monomeric and dimeric forms) of *Torpedo marmorata* reconstituted into phospholipid bilayers studied by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry*. 21: 5750-5755.
- daCosta CJB, Free CR, Corradi J, Bouzat C, Sine SM. (2011). Single-channel and structural foundations of neuronal  $\alpha 7$  acetylcholine receptor potentiation. *J Neurosci*. 31: 13870-13879.
- daCosta CJ, Dey L, Therien JP, Baenziger JE. (2013). A distinct mechanism for activating uncoupled nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Chem Biol*. 9: 701-707.
- daCosta CJ, Medaglia SA, Lavigne N, Wang S, Carswell CL, Baenziger JE. (2009). Anionic lipids allosterically modulate multiple nicotinic acetylcholine receptor conformational equilibria. *J Biol Chem*. 284: 33841-33849.
- daCosta CJ, Baenziger JE. (2009). A lipid-dependent uncoupled conformation of the acetylcholine receptor. *J Biol Chem*. 284: 17819-17825.
- daCosta CJ, Wagg ID, McKay ME, Baenziger JE. (2004). Phosphatidic acid and phosphatidylserine have distinct structural and functional interactions with the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem*. 279: 14967-14974.
- Dai Z, Luo X, Xie H, Peng HB. (2000). The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters. *J Cell Biol*. 150: 1321-1334.
- Daleke DL. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*. 44: 233-242.
- Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. (2007). Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol*. 203: 241-245.
- Daly JW. (2007). Caffeine analogs: biomedical impact. *Cell. Mol. Life Sci*. 64:2153-2169.
- Dalziel AW, Rollins ES, McNamee MG. (1980). The effect of cholesterol on agonist-induced flux in reconstituted acetylcholine receptor vesicles. *FEBS Lett*. 122: 193-196.
- Dani JA, Bertrand D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 47: 699-729.
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF. (1999). The 5-HT3B subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature*. 397: 359-63.
- De Martínez SG, Green C. (1979). The action of cholesterol oxidase on cholesterol in vesicles and micelles [proceedings]. *Biochem Soc Trans*. 7: 978-979.
- de Oliveira JR, Esteves Afonso Camargo S, Dias de Oliveira L. (2019). *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J Biomed Sci*. 26: 5.
- de Almeida RF, Loura LM, Prieto M, Watts A, Fedorov A, Barrantes FJ. (2004). Cholesterol modulates the organization of the gammaM4 transmembrane domain of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J*. 86: 2261-2272.
- Derkach V, Surprenant A, North RA. (1989). 5-HT3 receptors are membrane ion channels. *Nature*. 339: 706-709.
- Díaz-De León R, Otero-Cruz JD, Torres-Nuñez DA, Casiano A, Lasalde-Dominicci JA. (2008). Tryptophan scanning of the acetylcholine receptor's betaM4 transmembrane domain: decoding allosteric linkage at the lipid-protein interface with ion-channel gating. *Channels (Austin)*. 2: 439-448.

- Diaz-Rohrer BB, Levental KR, Simons K, Levental I. (2014). Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111: 8500-8505.
- Dies H, Topozini L, Rheinstädter MC. (2014). The interaction between amyloid- $\beta$  peptides and anionic lipid membranes containing cholesterol and melatonin. *PLoS One*. 9:e99124.
- Dineley KT, Bell KA, Bui D, Sweatt JD. (2002).  $\beta$ -Amyloid peptide activates  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 277: 25056–25061.
- Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe K., Sweatt JD. (2001). Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors: in vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 21: 4125–4133.
- Dineley KT, Pandya AA, Yakel JL. (2015). Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 36: 96-108.
- Dineley KT. (2007). Beta-amyloid peptide--nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease. *Front Biosci*. 12: 5030-5038.
- Ding WX, Qi XR, Li P, Maitani Y, Nagai T. (2005). Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. *Int J Pharm*. 300: 38-47.
- Domville JA, Baenziger JE. (2018). An allosteric link connecting the lipid-protein interface to the gating of the nicotinic acetylcholine receptor. *Sci Rep*. 1:3898.
- Dougherty DA, Stauffer DA. (1990). Acetylcholine binding by a synthetic receptor. Implications for biological recognition. *Science*. 250: 1558–1560.
- Dougherty DA. (2007). Cation- $\pi$  interactions involving aromatic amino acids. *J Nutr*. 137: 1504S-1508S; discussion 1516S-1517S.
- Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 187: 10-22.
- Echeverria V, Yarkov A, Aliev G. (2016). Positive modulators of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor against neuroinflammation and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 144: 142–157.
- Eckert A, Marques CA, Keil U, Schüssel K, Müller WE. (2003). Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1010: 604-609.
- Edmonds B, Gibb AJ, Colquhoun D. (1995). Mechanisms of activation of muscle nicotinic acetylcholine receptors and the time course of endplate currents. *Annu Rev Physiol*. 57: 469-493.
- Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*. 160: 113-123.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*. 79: 705-715.
- Elliott J, Blanchard SG, Wu W, Miller J, Strader CD, Hartig P, Moore HP, Racs J, Raftery MA. (1980). Purification of *Torpedo californica* post-synaptic membranes and fractionation of their constituent proteins. *Biochem J*. 185: 667-677.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres VIR, Featherstone RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 7: 88-95.
- Engel AG. (2008). The neuromuscular junction. *Handb Clin Neurol*. 91:103-148.
- Engel M, Smidt MP, van Hooft JA. (2013). The serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor: a novel neurodevelopmental target. *Front Cell Neurosci*. 7:76.
- Epstein M, Racker E. (1978). Reconstitution of carbamylcholine-dependent sodium ion flux and desensitization of the acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *J Biol Chem*. 253: 6660-6662.
- Esparza TJ, Wildburger NC, Jiang H, Gangolli M, Cairns NJ, Bateman RJ, Brody DL. (2016). Soluble amyloid-beta aggregates from human Alzheimer's disease brains. *Sci Rep*. 6: 1-16.
- Espinoza-Fonseca LM. (2004). Base docking model of the homomeric  $\alpha 7$  nicotinic receptor-beta-amyloid (1-42) complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 320: 587–591.
- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*. 5: 5-6.
- Fabiani C, Murray AP, Corradi J, Antollini SS. A Novel Pharmacological Activity of Caffeine in the

- Cholinergic System. *Neuropharmacology*. 135: 464-473.
- Fabiani C, Antollini SS. (2019). Alzheimer's Disease as a Membrane Disorder: Spatial Cross-Talk Among Beta-Amyloid Peptides, Nicotinic Acetylcholine Receptors and Lipid Rafts. *Front Cell Neurosci*. 13: 309.
- Fantini J, Di Scala C, Baier CJ, Barrantes FJ. (2016). Molecular mechanisms of protein-cholesterol interactions in plasma membranes: Functional distinction between topological (tilted) and consensus (CARC/CRAC) domains. *Chem Phys Lipids*. 199: 52-60.
- Fantini J, Di Scala C, Evans LS, Williamson PT, Barrantes FJ. (2016). A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological membranes. *Sci Rep*. 6: 21907.
- Fassbender K, Masters C, Beyreuther K. (2001). Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturwissenschaften*. 88: 261-267.
- Feller SE. (2008). Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: a comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids. *Chem Phys Lipids*. 153: 76-80.
- Feng Y, Wang X. (2012). Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2012: 472932.
- Fernandes CC, Berg DK, Gómez-Varela D. (2010). Lateral mobility of nicotinic acetylcholine receptors on neurons is determined by receptor composition, local domain, and cell type. *J Neurosci*. 30: 8841-8851.
- Fernández LF, Palomino OM, Frutos GJ (2014). Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life. *Ethnopharmacol*. 151: 509–516.
- Fernández Nievas GA, Barrantes FJ, Antollini SS. (2008). Modulation of nicotinic acetylcholine receptor conformational state by free fatty acids and steroids. *J Biol Chem*. 283: 21478-21486.
- Ferreira A, Proença C, Serralheiro MLM, Araújo MEM. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*. 108: 31-37.
- Ferreira JV, Capello TM, Siqueira LJ, Lago JH, Caseli L. (2016). Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air-Water Interface and Molecular Simulation. *Langmuir*. 32: 3234-3241.
- Fong TM, McNamee MG. (1986). Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. *Biochemistry*. 25: 830-840.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 66: 137-147.
- Fredholm BB, Bättig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev*. 51: 83-133.
- Fredholm BB. (1995). Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol*. 76: 93-101.
- Fritzsche KJ, Kim J, Holland GP. (2013). Probing lipid-cholesterol interactions in DOPC/eSM/Chol and DOPC/DPPC/Chol model lipid rafts with DSC and <sup>13</sup>C solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta*. 1828: 1889-1898.
- Gandhavadi M, Allende D, Vidal A, Simon SA, McIntosh TJ. (2002). Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys J*. 82: 1469-1482.
- Garcia-Alloza M, Gil-Bea FJ, Diez-Ariza M, Chen CP, Francis PT, Lasheras B, Ramirez MJ. (2005). Cholinergic-serotonergic imbalance contributes to cognitive and behavioral symptoms in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*. 43: 442-449.
- Speroni E, Cervellati R, Dall'Acqua S, Guerra MC, Greco E, Govoni P, Innocenti G. (2011). Gastroprotective Effect and Antioxidant Properties of Different *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. *J Med Food*. 14: 499-504.
- Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, Sanes JR. (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*. 85: 525-535.
- Geula C, Mesulam M. (1989). Special properties of cholinesterases in the cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 498: 185-189.
- Ghoshroy KB, Zhu W, Sampson NS. (1997). Investigation of membrane disruption in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Biochemistry*. 36: 6133-6140.

- Gilhus NE, Tzartos S, Evoli A, Palace J, Burns TM, Verschuuren JJGM. (2019). Myasthenia gravis. *Nat Rev Dis Primers*. 5: 30.
- Gill JK, Savolainen M, Young GT, Zwart R, Sher E, Millar NS. (2011). Agonist activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 5867–5872.
- Gilmore J, D'Amato S, Griffith N, Schwartzberg L. (2018). Recent Advances in Antiemetics: New Formulations of 5HT 3-receptor Antagonists. *Cancer Manag Res*. 10: 1827-1857.
- Gimpl G, Burger K, Fahrenholz F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry*. 36: 10959-10974.
- Glass DJ, DeChiara TM, Stitt TN, DiStefano PS, Valenzuela DM, Yancopoulos GD. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation and is a functional receptor for agrin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 61: 435-444.
- Glennon RA, Dukat M, Liao L. (2004). Musings on alpha4beta2 nicotinic acetylcholine (nACh) receptor pharmacophore models. *Curr Top Med Chem*. 4: 631-644.
- Gotteland M, Espinoza J, Cassels B, Speisky H. (1995). Effect of a dry boldo extract on oro-cecal intestinal transit in healthy volunteers. *Rev Med Chil*. 23: 955-960.
- Gottfries CG. (1990). Disturbance of the 5-hydroxytryptamine metabolism in brains from patients with Alzheimer's dementia. *J Neural Transm Suppl*. 30: 33-43.
- Götz J, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L. (2004). Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int J Dev Neurosci*. 22: 453-465.
- Grajales-Reyes JG, García-González A, María-Ríos JC, Grajales-Reyes GE, Delgado-Vélez M, Báez-Pagán CA, Quesada O, Gómez CM, Lasalde-Dominicci JA. (2017). A Panel of Slow-Channel Syndrome Mice Reveals a Unique Locomotor Behavioral Signature. *J Neuromuscul Dis*. 4: 341-347.
- Grieve M. (1984). A modern Herbal. Editorial Penguin. ISBN: 0486227995.
- Grossberg GT. (2003). Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr Ther Res Clin Exp*. 64: 216-235.
- Gu L, Guo Z. (2013). Alzheimer's Aβ42 and Aβ40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem*. 126: 305-311.
- Guerreiro S, Toulorge D, Hirsch E, Marien M, Sokoloff P, Michel PP. (2008). Paraxanthine, the primary metabolite of caffeine, provides protection against dopaminergic cell death via stimulation of ryanodine receptor channels. *Mol. Pharmacol*. 74: 980-989.
- Haass C. (1996). The molecular significance of amyloid beta-peptide for Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 246: 118-123.
- Hall ZW, Sanes JR. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*. 72: 99-121.
- Hamilton-Miller JM. (1995). Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrob Agents Chemother*. 39: 2375–2377.
- Hamilton-Miller JM. (2001). Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol*. 50: 299-302.
- Hamilton-Miller JM. (2004). Probiotics and prebiotics in the elderly. *J Postgrad Med J*. 80: 447-451.
- Hamouda AK, Chiara DC, Sauls D, Cohen JB, Blanton MP. (2006). Cholesterol interacts with transmembrane alpha-helices M1, M3, and M4 of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: photolabeling studies using [3H]Azicholesterol. *Biochemistry*. 45: 976-986.
- Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavedo E, Snyder PJ, Khachaturian ZS. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 141: 1917-1933.
- Hancock JF. (2006). Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7: 456-462.
- Hanna MC, Davies PA, Hales TG, Kirkness EF. (2000). Evidence for expression of heteromeric serotonin 5-HT(3) receptors in rodents. *J Neurochem*. 75: 240-247.
- Hapfelmeier G, Tredt C, Haseneder R, Zieglgänsberger W, Eisensamer B, Rupprecht R, Rammes G. (2003). Co-expression of the 5-HT3B serotonin receptor subunit alters the biophysics of the 5-HT3 receptor. *Biophys J*. 84: 1720-1733.
- Hardy J, Allsop D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 12: 383-388.

- Hardy JA, Higgins GA. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256; 184-185.
- Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 9031-9035.
- Harris FM, Best KB, Bell JD. (2002). Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim Biophys Acta*. 1565: 123-128.
- Harris JR. (2002). In vitro fibrillogenesis of the amyloid beta 1-42 peptide: cholesterol potentiation and aspirin inhibition. *Micron*. 33: 609-626.
- Hascup KN, Hascup ER. (2016). Soluble Amyloid- $\beta$ 42 Stimulates Glutamate Release through Activation of the  $\alpha$ 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *J Alzheimers Dis*. 53: 337-347.
- Hayden EY, Teplow DB. (2013). Amyloid  $\beta$ -protein oligomers and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 5: 60.
- Hénault CM, Sun J, Therien JP, daCosta CJ, Carswell CL, Labriola JM, Juranka PF, Baenziger JE. (2015). The role of the M4 lipid-sensor in the folding, trafficking, and allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*. 96: 157-168.
- Henderson Z, Matto N, John D, Nalivaeva NN, Turner AJ. (2010). Colocalization of PRiMA with acetylcholinesterase in cholinergic neurons of rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res*. 1344: 34-42.
- Hernando G, Bergé I, Rayes D, Bouzat C. (2012). Contribution of subunits to Caenorhabditis elegans levamisole-sensitive nicotinic receptor function. *Mol Pharmacol*. 82: 550-560.
- Hernando G, Turani O, Bouzat C. (2019). Caenorhabditis elegans muscle Cys-loop receptors as novel targets of terpenoids with potential anthelmintic activity. *PLoS Negl Trop Dis*. 13:e0007895.
- Herrup K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci*. 18: 794-799.
- Hertel C, Terzi E, Hauser N, Jakob-Rotne R, Seelig J, Kemp JA. (1997). Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 9412-9416.
- Heuser JE, Reese TS. (1981). Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*. 88: 564-580.
- Hicks DA, Nalivaeva NN, Turner AJ. (2012). Lipid rafts and Alzheimer's disease?: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front. Physiol*. 3: 189.
- Hill R, Wyse GA, Anderson, M. (2004). *Fisiología animal (4ta ed)*. Editorial médica panamericana.
- Hsieh CL, Peng CH, Chyau CC, Lin YC, Wang HE, Peng RY. (2007). Low-density lipoprotein, collagen, and thrombin models reveal that *Rosemarinus officinalis* L. exhibits potent antiglycative effects. *J Agric Food Chem*. 55: 2884-2891.
- Huang, J., y Feigenson, G. (1999). A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *W. Biophysical journal*. 76: 2142-2157.
- Hughes BW, Kusner LL, Kaminski HJ. (2006). Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve*. 33: 445-461.
- Hurst R, Rollema H, Bertrand D. (2012). Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther*. 137: 22-54.
- Igbavboa U, Avdulov NA, Schroeder F, Wood WG. (1996). Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice. *J Neurochem*. 66: 1717-1725.
- Inestrosa N C, Alvarez A, Calderón F. (1996). Acetylcholinesterase is a senile plaque component that promotes assembly of amyloid beta-peptide into Alzheimer's filaments. *Mol. Psychiatry* 1: 359-361.
- Inestrosa NC, Godoy JA, Vargas JY, Arrazola MS, Rios JA, Carvajal FJ, Serrano FG, Farias GG. (2013). Nicotine prevents synaptic impairment induced by amyloid- $\beta$  oligomers through  $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholine receptor activation. *NeuroMolecular Med*. 15: 549-569.
- Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM, Walsh DM. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med*. 14: 451-464.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an

- initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 13: 45-53.
- Jabeur I, Martins N, Barros L, Calhelha RC, Vaz J, Achour L, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. (2017). Contribution of the phenolic composition to the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor potential of *Equisetum giganteum L.* and *Tilia platyphyllos Scop.* *Food Funct.* 22: 975-984.
- Jafurulla M, Nalli A, Chattopadhyay A. (2017). Membrane cholesterol oxidation in live cells enhances the function of serotonin<sub>1A</sub> receptors. *Chem Phys Lipids*. 203: 71-77.
- Jaikishan S, Björkbom A, Slotte JP. (2010). Phosphatidyl alcohols: effect of head group size on domain forming properties and interactions with sterols. *Biochim Biophys Acta*. 1798: 1615-1622.
- Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. (2000). Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res*. 42: 361-371.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 32: 4693-4697.
- Jarvis GE, Barbosa R, Thompson AJ. (2016). Noncompetitive Inhibition of 5-HT<sub>3</sub> Receptors by Citral, Linalool, and Eucalyptol Revealed by Nonlinear Mixed-Effects Modeling. *J Pharmacol Exp Ther*. 356: 549-562.
- Ji SR, Wu Y, Sui SF. (2002). Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of beta-amyloid peptide (A beta 1-40), which may potentially inhibit the fibril formation. *J Biol Chem*. 277: 6273-6279.
- Johnson G, Moore SW, Curr (2006). The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Pharm Des*. 12: 217-225.
- Jones OT, McNamee M. (1988). Annular and nonannular binding sites for cholesterol associated with the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*. 27: 2364-2374.
- Juza R, Vlcek P, Mezeiova E, Musilek K, Soukup O, Korabecny J. (2020). Recent Advances With 5-HT<sub>3</sub> Modulators for Neuropsychiatric and Gastrointestinal Disorders. *Med Res Rev*. 40: 1593-1678.
- Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin M. (2002). The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides* 23: 1311-1315.
- Kamal Z, Ullah F, Ayaz M, Sadiq A, Ahmad S, Zeb A, Hussain A, Imran M. (2015). Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *Atriplex laciniata L.*: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. *Biol. Res*. 48: 21.
- Kandimalla R, Reddy PH. (2017). Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 57: 1049-1069.
- Kanfer JN, Sorrentino G, Sitar DS. (1999). Amyloid beta peptide membrane perturbation is the basis for its biological effects. *Neurochem. Res*. 24: 1621-1630.
- Kang M, Day CA, Kenworthy AK, DiBenedetto E. (2012). Simplified equation to extract diffusion coefficients from confocal FRAP data. *Traffic*. 13: 1589-1600.
- Karadsheh N, Kussie P, Linthicum DS. (1991). Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives. *Toxicol. Lett*. 55: 335-342.
- Karlin A. (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*. 3: 102-114.
- Karthik D, Viswanathan P, Anuradha CV. (2011). Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 58: 514-521.
- Kawahara M. (2010). Neurotoxicity of b-amyloid protein: oligomerization, channel formation, and calcium dyshomeostasis. *Curr. Pharm. Des*. 16: 2779-2789.
- Kawai H, Raftery MA. (2010). Kinetics of agonist-induced intrinsic fluorescence changes in the Torpedo acetylcholine receptor. *J. Biochem*. 147: 743-749.
- Kayashima T, Matsubara K. (2012). Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. *Biosci Biotechnol Biochem*. 76: 115-119.

- Kelley S, Dunlop JI, Firkness EF, Lambert JJ, Peters JA. (2003). A Cytoplasmic Region Determines Single-Channel Conductance in 5-HT<sub>3</sub> Receptors. *Nature*. 424: 321-324.
- Kellner RR, Baier CJ, Willig KI, Hell SW, Barrantes FJ. (2007). Nanoscale organization of nicotinic acetylcholine receptors revealed by stimulated emission depletion microscopy. *Neuroscience*. 144: 135-143.
- Kennedy D. O., Scholey A. B. (2006). The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancing properties. *Current Pharmaceutical Design*. 12:4613-4623.
- Khan GM, Tong M, Jhun M, Arora K, Nichols RA. (2010).  $\beta$ -Amyloid activates presynaptic  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptors reconstituted into a model nerve cell system: involvement of lipid rafts. *Eur J Neurosci*. 31: 788-796.
- Kim YS, Kwak SM, Myung SK. (2015). Caffeine intake from coffee or tea and cognitive disorders: a meta-analysis of observational studies. *Neuroepidemiology*. 44: 51-63
- Klein WL, Stine WB Jr, Teplow DB. (2004). Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 25: 569-580.
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 5815-5820.
- Kolahdouzan M, Hamadeh MJ. (2017). The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci. Ther.* 23: 272-290.
- Kovacs GG, Klöppel S, Fischer I, Dorner S, Lindeck-Pozza E, Birner P, Bötöfür IC, Pilz P, Volk B, Budka H. (2003). Nucleus-specific alteration of raphe neurons in human neurodegenerative disorders. *Neuroreport*. 14: 73-76.
- Krainev AG, Ferrington DA, Williams DT, Squier TC, Bigelow DJ. (1995). Adaptive changes in lipid composition of skeletal sarcoplasmic reticulum membranes associated with aging. *Biochim Biophys Acta* 1235: 406-418.
- Kua J, Zhang Y, Eslami AC, Butler JR, McCammon JA. (2003). Studying the roles of W86, E202, and Y337 in binding of acetylcholine to acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *Protein Sci*. 12: 2675-2684.
- Kubsch B, Robinson T, Lipowsky R, Dimova R. (2016). Solution Asymmetry and Salt Expand Fluid-Fluid Coexistence Regions of Charged Membranes. *Biophys J*. 110: 2581-2584.
- Kubsch B, Robinson T, Steinkühler J, Dimova R. (2017). Phase Behavior of Charged Vesicles Under Symmetric and Asymmetric Solution Conditions Monitored with Fluorescence Microscopy. *J Vis Exp*. 24: 56034.
- Kulig W, Tynkkynen J, Javanainen M, Manna M, Rog T, Vattulainen I, Jungwirth P. (2014). How well does cholesteryl hemisuccinate mimic cholesterol in saturated phospholipid bilayers? *J. Mol. Model*. 20: 2121.
- Kulig W, Jurkiewicz P, Olżyńska A, Tynkkynen J, Javanain M, Manna M, Rog T, Hof M, Vattulainen I, Jungwirth P. (2015). Experimental determination and computational interpretation of biophysical properties of lipid bilayers enriched by cholesteryl hemisuccinate. *Biochim et Biophys Acta*. 1848: 422-432.
- Kumar A, Singh A, Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol Reports*. 67: 195-203.
- Kumar A, Nisha CM, Silakari C, Sharma I, Anusha K, Gupta N, Nair P, Tripathi T, Kumar A. (2016). Current and novel therapeutic molecules and targets in Alzheimer's disease. *J Formos Med Assoc*. 115: 3-10.
- Kusumi A, Suzuki K. (2005). Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta*. 1746: 234-251.
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*. 24: 10191-10200.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lahdo R, De La Fournière-Bessueille L. (2004). Insertion of the amyloid precursor protein into lipid monolayers: effects of cholesterol and apolipoprotein E. *Biochem J*. 382:987-994.
- Lai MK, Tsang SW, Francis PT, Esiri MM, Keene J, Hope T, Chen CP. (2003). Reduced serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in the temporal cortex correlates with aggressive behavior in Alzheimer disease. *Brain Res*. 974: 82-87.
- Laskowski RA, Rullmannn JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. (1996). AQUA and

- PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*. 8: 477-486.
- Lakowicz JR, Bevan DR, Maliwal BP, Cherek H, Balter A. (1983). Synthesis and Characterization of a Fluorescence Probe of the Phase Transition and Dynamic Properties of Membranes. *Biochemistry*. 22: 5714-5722.
- Lansdell SJ, Sathyaprakash C, Doward A, Millar NS. (2015). Activation of human 5-hydroxytryptamine type 3 receptors via an allosteric transmembrane site. *Mol Pharmacol*. 87: 87-95.
- Lape R, Colquhoun D, Sivilotti LG. (2008). On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature*. 454: 722-727.
- Lario PI, Sampson N, Vrielink A.J (2003). Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: what atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. *Mol Biol*. 326: 1635-1650.
- Lasala M, Corradi J, Bruzzone A, Esandi MDC, 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.
- Lasalde JA, Tamamizu S, Butler DH, Vibat CR, Hung B, McNamee MG. (1996). Tryptophan substitutions at the lipid-exposed transmembrane segment M4 of Torpedo californica acetylcholine receptor govern channel gating. *Biochemistry*. 35: 14139-14148.
- Launert E. (1981). Hamlyn Guide - Edible/medicinal Plants. Editorial Hamlyn. ISBN 0-600-37216-2
- Lauriault J. (1989). Identification Guide to the Trees of Canada. Editorial Fitzhenry and Whiteside, Ontario. ISBN 0889025649.
- Le Novère N, Changeux JP. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol*. 40: 155-172.
- Le Novère N, Changeux JP. (2001). LGICdb: the ligand-gated ion channel database. *Nucleic Acids Res*. 29: 294-295.
- Le Novère N, Corringer PJ, Changeux JP. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol*. 53: 447-456.
- Lee AG. (2003). Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta*. 1612: 1-40.
- Lee EH, Shin JH, Kim SS, Lee H, Yang SR, Seo SR. (2019). *Laurus nobilis* leaf extract controls inflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Physiol* 234: 6854-6864.
- Lee J, Lentz BR. (1997). Outer leaflet-packing defects promote poly(ethylene glycol)-mediated fusion of large unilamellar vesicles. *Biochemistry*. 36: 421-431.
- Lee SJ, Liyanage U, Bickel PE, Xia W, Lansbury PT Jr, Kosik KS. (1998). A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med*. 4: 730-734.
- Lee WY, Sine SM. (2005) Principal pathway coupling agonist binding to channel gating in nicotinic receptors. *Nature*. 438: 243-247.
- Lee YH, Li L, Lasalde J, Rojas L, McNamee M, Ortiz-Miranda SI, Pappone P. (1994). Mutations in the M4 domain of Torpedo californica acetylcholine receptor dramatically alter ion channel function. *Biophys J*. 66: 646-653.
- Leibel WS, Firestone LL, Legler DC, Braswell LM, Miller KW. (1987). Two pools of cholesterol in acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo. *Biochim Biophys Acta*. 897: 249-260.
- Lendvai B, Szájlí A, Némethy Z. (2013).  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Res Bull*. 93: 86-96.
- Lentz B. (1993). Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem Phys Lipids*. 64: 99-116.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA. (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci*. 27: 329-336.
- Levental I, Veatch S. (2016). The Continuing Mystery of Lipid Rafts. *J Mol Biol* 48: 4749-4764.
- Levental KR, Lorent JH, Lin X, Skinkle AD, Surma MA, Stockenbojer EA, Gorfe AA, Levental I. (2016). Polyunsaturated Lipids Regulate Membrane Domain Stability by Tuning Membrane Order. *Biophys J*. 110: 1800-1810.
- Li SF, Wu MN, Wang XH, Yuan L, Yang D, Qi JS. (2011). Requirement of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors for amyloid beta protein-Induced depression of hippocampal long-term potentiation in CA1 region of rats in vivo. *Synapse*. 65: 1136-1143.
- Lichtenberg D, Goñi FM, Heerklötz H. (2005). Detergent-resistant membranes should not be

- identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci.* 30: 430-436.
- Lin H, Bhatia R, Lal R. (2001). Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's diseases pathophysiology. *FASEB J.* 15: 2433-2444.
- Lin Q, London EJ. (2014). The influence of natural lipid asymmetry upon the conformation of a membrane-inserted protein (perfringolysin O). *Biol Chem.* 289: 5467-5478.
- Lin H, Bhatia R, Lal R. Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* 15: 2433-2444.
- Lingwood D, Simons K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science.* 327: 46-50.
- Lindstrom J. (2002). Autoimmune diseases involving nicotinic receptors. *J Neurobiol.* 53: 656-65.
- Liscum L, Underwood KW. (1995). Intracellular cholesterol transport and compartmentalization. *J Biol Chem.* 270: 15443-15446.
- Liu Q, Kawai H, Berg DK. (2001). Beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 4734-4739.
- Liu Q, Xie X, Emadi S, Sierks MR, Wu J. (2015). A novel nicotinic mechanism underlies  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology.* 97:457-463, Elsevier Ltd.
- Liu Y, Dilger JP. (1991). Opening rate of acetylcholine receptor channels. *Biophys J.* 60:424-432.
- Lombardo S, Maskos U. (2015). Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology.* 96:255-262.
- London E. (2005). How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochim Biophys Acta.* 1746: 203-220.
- Lovinger DM, Zhou Q. (1998). Alcohol effects on the 5-HT<sub>3</sub> ligand-gated ion channel. *Tox Lett.* 100: 239-246.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-75.
- Lozon Y, Sultan A, Lansdell SJ, Prytkova T, Sadek B, Yang KH, Howarth FC, Millar NS, Oz M. (2016). Inhibition of human  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors by cyclic monoterpene carveol. *Eur J Pharmacol.* 776: 44-51.
- Lukiw WJ. (2013). Alzheimer's disease (AD) as a disorder of the plasma membrane. *Front. Physiol.* 4: 24.
- Lummis SC. (2012). 5-HT<sub>3</sub> receptors. *J Biol Chem.* 287: 40239-49245.
- Lurtz MM, Pedersen SE. (1999). Aminotriarylmethane dyes are high-affinity noncompetitive antagonists of the nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol.* 55: 159-167.
- Ma KG, Qian YH. (2018). Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. *Neuropeptides.* 73: 96-106.
- Maconochie DJ, Fletcher GH, Steinbach JH. (1995). The conductance of the muscle nicotinic receptor channel changes rapidly upon gating. *Biophys J.* 68: 483-490.
- Maia MA, Sousa E. (2019). BACE-1 and  $\gamma$ -Secretase as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals (Basel).* 19: 12.
- Mantipragada SB, Horváth LI, Arias HR, Schwarzmann G, Sandhoff K, Barrantes FJ, Marsh D. (2006). Lipid-protein interactions and effect of local anesthetics in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *Biochemistry.* 42: 9167-9175.
- Marchand S, Devillers-Thiéry A, Pons S, Changeux JP, Cartaud J. (2002). Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J Neurosci.* 22: 8891-8901.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. (1991). Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science.* 254: 432-437.
- Marsh D, Barrantes FJ. (1978). Immobilized lipid in acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75: 4329-4333.
- Martinez-Seara H, Róg T, Karttunen M, Vattulainen I, Reigada R. (2010). Cholesterol induces specific spatial and orientational order in cholesterol/phospholipid membranes. *PLoS One.* 5:e11162.
- Martins A, Schimidt HL, Garcia A, Colletta Altermann CD, Santos FW, Carpes FP, da Silva WC,

- Mello-Carpes PB. (2017). Supplementation with different teas from *Camellia sinensis* prevents memory deficits and hippocampus oxidative stress in ischemia-reperfusion. *Neurochem. Int.* 108: 287-295.
- Martorana A, Esposito Z, Koch G. (2010). Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease? *CNS Neurosci Ther.* 16: 235-245.
- Mason RP, Shoemaker WJ, Shajenko L, Chambers TE, Herbette LG. (1992). Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol Aging.* 13: 413-419.
- Massey JB. (1998). Effect of cholesteryl hemisuccinate on the interfacial properties of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim et Biophys Acta (BBA) – Biomembranes.* 1415: 193-204.
- Massoulié J, Bon S, Perrier N, Falasca C. (2005). The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact.* 15:3-14.
- Matthews-Bellinger J, Salpeter MM. (1978). Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. *J Physiol.* 279: 197-213.
- Mayor S, Rao M. (2004). Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. *Traffic.* 5: 231-240.
- McIntosh T. J. (2003). Organization of skin stratum corneum extracellular lamellae: diffraction evidence for asymmetric distribution of cholesterol. *Biophysical journal.* 85: 1675-1681.
- McMahan UJ. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 55: 407-418.
- Miles TF, Lester HA, Dougherty DA. (2015). Allosteric activation of the 5-HT3AB receptor by mCPBG. *Neuropharmacology.* 91: 103-108.
- Mondal M., Mesmin B., Mukherjee S., Maxfield F. R. (2009). Sterols are mainly in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane and the endocytic recycling compartment in CHO cells. *Mol Biol Cell.* 20: 581–588.
- Moore MA, McCarthy MP. (1994). The effects of drugs on the incorporation of a conformationally-sensitive, hydrophobic probe into the ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem. Biophys Acta.* 1190: 457-464.
- Moore MA, McCarthy MP. (1995). Snake venom toxins, unlike smaller antagonists, appear to stabilize a resting state conformation of the nicotinic acetylcholine receptor. *BBA - Biomembr* 1235: 336-342.
- Morales-Pérez CL, Noviello CM, Hibbs RE. (2016). X-ray structure of the human  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor. *Nature.* 538: 411-415.
- Morán MA, Mufson EJ, Gómez-Ramos P. (1993). Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol.* 85: 362-369.
- Mott DD, Erreger K, Banke TG, Traynelis SF. (2001). Open probability of homomeric murine 5-HT3A serotonin receptors depends on subunit occupancy. *J Physiol.* 535: 427-443.
- Mukhtasimova N, Lee WY, Wang HL, Sine SM. (2009). Detection and Trapping of Intermediate States Priming Nicotinic Receptor Channel Opening. *Nature.* 459: 451-454.
- Müller WE, Kirsch C, Eckert GP. (2001). Membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 617-623.
- Müller WE, Koch S, Eckert A, Hartmann H, Scheuer K. (1995).  $\beta$ -amyloid peptide decreases membrane fluidity. *Brain Res.* 674: 133-136.
- Munro L, Ladefoged LK, Padmanathan V, Andersen S, Schiøtt B, Kristensen AS. (2019). Conformational Changes in the 5-HT3A Receptor Extracellular Domain Measured by Voltage-Clamp Fluorometry. *Mol Pharmacol.* 96: 720-734.
- Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, Marchi M. (2012). Dual Effect of Beta-Amyloid on  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  Nicotinic Receptors Controlling the Release of Glutamate, Aspartate and GABA in Rat Hippocampus. *PLoS One.* 7:e29661.
- Narayanaswami V, McNamee MG. (1993). Protein-lipid interactions and Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor function. 2. Membrane fluidity and ligand-mediated alteration in the accessibility of gamma subunit cysteine residues to cholesterol. *Biochemistry.* 32: 12420-12427.
- Näslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J, Gandy SE, Winblad B, Greengard P. (1994). Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Aca Sci USA.* 91: 8378–8382.
- Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K. L., Davies, P., Greengard, P, Duxbaum JD. (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-

- peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283: 1571–1577. *Nat Med.* 14: 837-842.
- Navanesan S, Wahab NA, Manickam S, Sim KS. (2015). Evaluation of selected biological capacities of *Baeckea frutescens*. *BMC Complement Altern. Med.* 15: 186.
- Navaratnam DS, Fernando FS, Priddle JD, Giles K, Clegg SM, Pappin DJ, Craig I, Smith AD. (2000). Hydrophobic protein that copurifies with human brain acetylcholinesterase: amino acid sequence, genomic organization, and chromosomal localization. *J neurochem.* 74: 2146-2153.
- Nayak TK, Chakraborty S, Zheng W & Auerbach A. (2016). Structural correlates of affinity in fetal versus adult endplate nicotinic receptors. *Nat Commun.* 7: 11352.
- Neher E, Steinbach JH. (1978). Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol.* 277: 153-176.
- Neuvonen M, Manna M, Morkkila S, Javanainen M, Rog T, Liu Z, Bittman R, Vattulainen I, Ikonen E. (2014). Enzymatic oxidation of cholesterol: properties and functional effects of cholesterol in cell membranes. *PLoS One.* 9:e103743.
- Newman AS, Batis N, Grafton G, Caputo F, Brady CA, Lambert JJ, Peters JA, Gordon J, Brain KL, Powell AD, Barnes NM. (2013). 5-Chloroindole: a potent allosteric modulator of the 5-HT<sub>3</sub> receptor. *Br J Pharmacol.* 169: 1228-1238.
- Ng YP, Or TCT, Ip NY. (2015). Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 89: 260-270.
- Nicolson GL. (2014). The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta.* 1838: 1451-1466.
- Niesler B, Walstab J, Combrink S, Möller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bönisch H, Göthert M, Rappold G, Brüss M. (2007). Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub>, and 5-HT<sub>3E</sub>. *Mol Pharmacol.* 72: 8-17.
- Niesler B. (2011). 5-HT<sub>3</sub> receptors: potential of individual isoforms for personalised therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 11: 818-826.
- Niu X, Zhang X, Xie J, Zhang X. (2012). Acetylcholinesterase blocks cleavage of APP by  $\gamma$ -secretase in 293 cells and mouse brain. *Mol. Neurodegener.* 7:S11.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Miyata T, and Numa S. (1982). Primary structure of  $\alpha$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature.* 299: 793-797.
- Nordberg A, Svensson AL. (1998). Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Saf.* 19: 465-480.
- Nys M, Kesters D, Ulens C. (2013). Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem Pharmacol.* 86: 1042-1053.
- Ochoa EL, Dalziel AW, McNamee MG. (1983). Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochim Biophys Acta.* 727: 151-162.
- Okello EJ, Leylabi R, McDougall GJ. (2012). Inhibition of acetylcholinesterase by green and white tea and their simulated intestinal metabolites. *Food Funct* 3: 651.
- Ortiz-Acevedo A, Melendez M, Asseo AM, Biaggi N, Rojas LV, Lasalde-Dominicci JA. (2004). Tryptophan scanning mutagenesis of the gammaM4 transmembrane domain of the acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *J Biol Chem.* 279: 42250-42257.
- Oz M, Zhang L, Spivak CE. (2002). Direct noncompetitive inhibition of 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated responses by forskolin and steroids. *Arch Biochem Biophys.* 404: 293-301.
- Oz M. (2006). Receptor-independent actions of cannabinoids on cell membranes: focus on endocannabinoids. *Pharmacol Ther.* 111: 114-144.
- Pal R, Barenholz Y, Wagner RR.J. (1980). Effect of cholesterol concentration on organization of viral and vesicle membranes. Probed by accessibility to cholesterol oxidase. *Biol Chem.* 255: 5802-5806.
- Palma E, Bertrand S, Binzoni T, Bertrand D. (1996). Neuronal nicotinic  $\alpha 7$  receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *J Physiol.* 491: 151-161.
- Pandya A, Yakel JL. (2011). Allosteric modulator desformylflustrabromine relieves the inhibition of  $\alpha 2\beta 2$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors by  $\beta$ -amyloid 1-42 peptide. *J Mol Neurosci.* 45: 42–47.
- Parasassi T, De Stasio G, d'Ubaldo A, Gratton E. (1990). Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys J.* 57: 1179-1186.

- Parasassi T, De Stasio G, Ravagnan G, Rusch RM, Gratton E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J*. 60: 179-189.
- Parihar MS, Brewer GJ. (2011). Amyloid Beta as a Modulator of Synaptic Plasticity. *J Alzheimers Dis*. 22: 741-763.
- Parri HR, Hernandez CM, Dineley KT. (2011). Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 82: 931-942.
- Pascual JM, Karlin A. (1998). Delimiting the binding site for quaternary ammonium lidocaine derivatives in the acetylcholine receptor channel. *J Gen Physiol*. 112: 611-621.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol*. 73: 201-214.
- Pascual JM, Karlin A. (1998). Delimiting the binding site for quaternary ammonium lidocaine derivatives in the acetylcholine receptor channel. *J Gen Physiol*. 112: 611-621.
- Paterson D, Nordberg A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol*. 61: 75-111.
- Pato C, Stetzkowski-Marden F, Gaus K, Recouvreur M, Cartaud A, Cartaud J. (2008). Role of lipid rafts in agrin-elicited acetylcholine receptor clustering. *Chem Biol Interact*. 175: 64-67.
- Patzer, E, Wagner, R, and Barenholz, Y. (1978). Cholesterol oxidase as a probe for studying membrane organisation. *Nature* 274: 394-395.
- Pediconi MF, Gallegos CE, De Los Santos EB, Barrantes FJ. (2004). Metabolic cholesterol depletion hinders cell-surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroscience*. 128: 239-249.
- Perillo VL, Peñalva DA, Vitale AJ, Barrantes FJ, Antollini SS. (2016). Transbilayer asymmetry and sphingomyelin composition modulate the preferential membrane partitioning of the nicotinic acetylcholine receptor in Lo domains. *Arch Biochem Biophys*. 591: 76-86.
- Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. (2002). PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*. 33: 275-285.
- Perry EK, Curtis M, Dick DJ, Candy JM, Atack JR, Bloxham CA, Blessed G, Fairbairn A, Tomlinson BE, Perry RH. (1985). Cholinergic correlates of cognitive impairment in Parkinson's disease: comparisons with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 48: 413-421.
- Perry RH, Dockray GJ, Dimaline R, Perry EK, Blessed G, Tomlinson BE. (1981). Neuropeptides in Alzheimer's disease, depression and schizophrenia. A post mortem analysis of vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin in cerebral cortex. *J Neurol Sci*. 51: 465-472.
- Peters I, Igbavboa U, Schütt T, Haidari S, Hartig U, Rosello X, Böttner S, Copanaki E, Deller T, Kögel D, Wood WG, Müller WE, Eckert PK. (2009). The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochim Biophys Acta* 1788: 964-972.
- Peters JA, Hales TG, Lambert JJ. (2005). Molecular determinants of single-channel conductance and ion selectivity in the Cys-loop family: insights from the 5-HT3 receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 26: 587-594.
- Petruzielo RS, Heberle FA, Drazba P, Katsaras J, Feigenson GW. (2013). Phase behavior and domain size in sphingomyelin-containing lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 1828: 1302-1313.
- Pettit DL, Shao Z, Yakel JL. (2001). Beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci*. 21:RC120.
- Piguet J, Schreiter C, Segura JM, Vogel H, Hovius R. (2010). Acetylcholine receptor organization in membrane domains in muscle cells: evidence for rapsyn-independent and rapsyn-dependent mechanisms. *J Biol Chem*. 286: 363-369.
- Pohanka M. (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 155: 219-229.
- Pohanka M, Dobes P. (2013). Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *Int J Mol Sci*. 14: 9873-9882.
- Pollard HB, Arispe N, Rojas E. (1995). Ion Channel Hypothesis for Alzheimer Amyloid Peptide Neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol*. 15: 513-526.
- Post M., Lester H. A., Dougherty D. A. (2017). Probing for and quantifying agonist hydrogen bonds in  $\alpha 6\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry*. 56: 1836-1840.
- Price KL, Hirayama Y, Lummis SCR. (2017). Subtle Differences among 5-HT3AC, 5-HT3AD, and 5-HT3AE Receptors Are Revealed by Partial Agonists. *ACS Chem Neurosci*. 8: 1085-1091.

- Price KL, Lummis SC. (2014). An atypical residue in the pore of *Varroa destructor* GABA-activated RDL receptors affects picrotoxin block and thymol modulation. *Insect Biochem Mol Biol.* 55: 19-25.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams M. Sunderland. (2001). *Neuroscience (2nd ed)*. Editorial Sinauer Associates.
- Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A. (2015). The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A $\beta$  physiology. *Neuroscience.* 307: 26-36.
- Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O. (2011). Endogenous amyloid- $\beta$  is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* 69: 819-830.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa' M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 28: 14537-14545.
- Qiang W, Yau WM, Schulte J. (2014). Fibrillation of b amyloid peptides in the presence of phospholipid bilayers and the consequent membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* 1848: 266-276.
- Quinn DM. (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87: 955-979.
- Qin F, Auerbach A, Sachs F. (1996). Estimating single channel kinetic parameters from idealized patch-clamp data containing missed events. *Biophys J.* 70: 264-280.
- Qin F, Auerbach A, Sachs F. (1997). Maximum likelihood estimation of aggregated Markov processes. *Proc R Soc Lond.* 264: 375-383.
- Quinn PJ. (2002). Plasma membrane phospholipid asymmetry. *Subcell Biochem.* 36: 39-60.
- Kubínová R, Machala R, Minksová K, Neca J, Suchý V. (2001). Chemoprotective activity of boldine: modulation of drug-metabolizing enzymes. *Pharmazie* 56: 242-243.
- Ramadan KS, Khalil OA, Danial EN, Alnahdi HS, Ayaz NO. (2013). Hypoglycemic and hepatoprotective activity of *Rosmarinus officinalis* extract in diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 69: 779-783.
- Ramarao MK, Cohen JB. (1998). Mechanism of nicotinic acetylcholine receptor cluster formation by rapsyn. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 4007-4012.
- Rankin SE, Addona GH, Kloczewiak MA, Bugge B, Miller KW. (1997). The cholesterol dependence of activation and fast desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J.* 73: 2446- 2455.
- Reid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T. (2007). Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med.* 11: 383-392.
- Relini A, Marano N, Gliozzi A. (2014). Probing the interplay between amyloidogenic proteins and membranes using lipid monolayers and bilayers. *Adv Colloid Interface Sci.* 207: 81-92.
- Reyes AE, Perez DR, Alvarez A, Garrido J, Gentry MK, Doctor BP. (1997). A monoclonal antibody against acetylcholinesterase inhibits the formation of amyloid fibrils induced by the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun.* 232: 652-655.
- Roccamo AM, Pediconi MF, Aztiria E, Zanello L, Wolstenholme A, Barrantes FJ. (1999). Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Neurosci.* 11: 1615-1623.
- Rodriguez Araujo N, Fabiani C, Mazzarini Dimarco A, Bouzat C, Corradi J. (2020). Orthosteric and allosteric activation of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors. *Biophys J.* 119: 1670-1682.
- Rondelli V, Brocca P, Motta S, Messa M, Colombo L, Salmona M, Fragneto G, Cantù L, Del Favero E. (2016). Amyloid - b Peptides in interaction with raft-mime model membranes: a neutron reflectivity insight. *Sci Rep.* 16:20997.
- Roth GS, Joseph JA, Mason RP. (1995). Membrane alterations as causes of impaired signal transduction in Alzheimer's disease and aging. *Trends Neurosci.* 18: 203-206.
- Rothman JE, Lenard J. (1977). Membrane asymmetry. *Science.* 195: 743-753.
- Rouquette-Jazdanian AK, Pelassy C, Breittmayer JP, Aussel C. (2006). Reevaluation of the role of cholesterol in stabilizing rafts implicated in T cell receptor signalling. *Cell Signal* 18: 105-122.
- Rouser G, Yamamoto A. (1968). Curvilinear regression course of human brain lipid composition changes with age. *Lipids.* 3: 284-287.
- Rushworth JV, Hooper NM. (2010). Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Production,

- Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *Int J Alzheimers Dis.* 27:603052.
- Ryan SE, Demers CN, Chew JP, Baenziger JE. (1996). Structural effects of neutral and anionic lipids on the nicotinic acetylcholine receptor. An infrared difference spectroscopy study. *J Biol Chem.* 271: 24590-24597.
- Saladin K. (2011). *Human anatomy (3rd ed)*. Editorial McGraw-Hill.
- Samsonov AV, Mihalyov I, Cohen FS (2001). Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys J.* 81: 1486-1500.
- Sampson NS. (2001). Dissection of a flavoenzyme active site: the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Antioxid Redox Signal.* 3: 839-846.
- Sampson NS, Vrieling A. (2003). Cholesterol oxidases: a study of nature's approach to protein design. *Acc Chem Res.* 36: 713-722.
- Santiago J, Guzmán GR, Rojas LV, Martí R, Asmar-Rovira GA, Santana LF, McNamee M, Lasalde-Dominicci JA. (2001). Probing the effects of membrane cholesterol in the Torpedo californica acetylcholine receptor and the novel lipid-exposed mutation alpha C418W in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 276: 46523-46532.
- Sauguet L, Shahsavari A, Poitevin F, Huon C, Menny A, Nemečková A, Haouz A, Changeux JP, Corringer PJ, Delarue M. (2014). Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111: 966-971.
- Sauguet L, Shahsavari A, y Delarue M (2015) Crystallographic studies of pharmacological sites in pentameric ligand-gated ion channels. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1850: 511-523.
- Sayyah M, Saroukhani G, Peirovi A, Kamalinejad M. (2003). Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytother Res.* 17: 733-736.
- Schaaf CP. (2014). Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease. *Genet Med.* 16: 649-656.
- Scheckel KA, Degner SC, Romagnolo DF. (2008). Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J Nutr.* 138: 2098-2105.
- Schimdt HL, Garcia A, Martins A., Mello-Carpes PB, Carpes FP. (2017). Green tea supplementation produces better neuroprotective effects than red and black tea in Alzheimer-like rat model. *Food Res Int.* 100:442-448.
- Schmeda-Hirschmann G, Rodriguez JA, Theoduloz C, Astudillo SL, Feresin GE, Tapia A (2003). Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free Radic Res.* 37: 447-452.
- Schroeder F, Frolov AA, Murphy EJ, Atshaves BP, Jefferson JR, Pu L, Wood WG, Foxworth WB, Kier AB. (1996). Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking. *Proc Soc Exp Biol Med.* 213: 150-177.
- Schroeder F. (1985). Fluorescence probes unravel asymmetric structure of membranes. *Subcell Biochem.* 11: 51-101.
- Schroeder F, Frolov AA, Murphy EJ, Atshaves BP, Jefferson JR, Pu L, Wood WG, Foxworth WB, Kier AB. (1996). Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking. *Proc Soc Exp Biol Med.* 213: 150-177.
- Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. (2006). Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 29: 647-654.
- Seel W, Baust D, Sons D, Albers M, Eitzbach L, Fuss J, Lipski A. (2020). Carotenoids are used as regulators for membrane fluidity by *Staphylococcus xylosum*. *Sci Rep.* 10: 330.
- Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, 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 FJ, Fierro H, Fernandez E, Castillo C, Peoples RW, Opazo C, Aguayo LC. (2014). Nature of the neurotoxic membrane actions of amyloid- $\beta$  on hippocampal neurons in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 5: 472-481.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1:a006189.
- Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18: 361-374.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA,

- Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. (2008). Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 14: 837-842.
- Sharangi AB (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis L.*) - A review. *Food Res.Int.* 425: 529-535.
- Sharp L, Salari R, Brannigan G. (2019). Boundary lipids of the nicotinic acetylcholine receptor: Spontaneous partitioning via coarse-grained molecular dynamics simulation. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1861: 887-896.
- Shimohama S, Taniguchi T, Fujiwara M, Kameyama M. (1986). Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem.* 46: 288-293.
- Shinitzky M, Yuli I. (1982). Lipid fluidity at the submacroscopic level: determination by fluorescence polarization. *Chem. Phys. Lipids.* 30: 261-282.
- Simons K, Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1: 31-39.
- Simons K, Gerl MJ. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11: 688-699.
- Simons K, Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387: 569-572.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:6460-6464.
- Sine SM, Engel AG. (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature.* 440:448-455.
- Singer SJ, Nicolson GL. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175: 720-31.
- Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* 82: 1807-1821.
- Skovgård K, Agerskov C, Kohlmeier KA, Herrik KF. (2018). The 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ondansetron potentiates the effects of the acetylcholinesterase inhibitor donepezil on neuronal network oscillations in the rat dorsal hippocampus. *Neuropharmacology.* 143: 130-142.
- Small DH, Maksić D, Kerr M., Ng J, Hou X, Chu C, Mehrani H, Unabia S, Azari MF, Loiacono R, Aguilar MI, Chebib M. (2007). The b-amyloid protein of Alzheimer's disease binds to membrane lipids but does not bind to the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *J. Neurochem.* 101: 1527-1538.
- Smith A. (2002). Effects of caffeine on human behavior. *Food Chem Toxicol.* 40: 1243-1255.
- Solt K, Ruesch D, Forman SA, Davies PA, Raines DE. (2007). Differential effects of serotonin and dopamine on human 5-HT<sub>3A</sub> receptor kinetics: interpretation within an allosteric kinetic model. *J Neurosci.* 27: 13151-13160.
- Sonnino S, Prinetti A. (2013). Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Curr Med Chem.* 20: 4-21.
- Soto-Arriaza MA, Olivares-Ortega C, Quina FH, Aguilar LF, Sotomayor CP. *Biochim Biophys Acta.* (2013). Effect of cholesterol content on the structural and dynamic membrane properties of DMPC/DSPC large unilamellar bilayers. 1828: 2763-2769.
- Soung HS, Wang MH, Tseng HC, Fang HW, Chang KC. (2015). (-)Epigallocatechin-3-gallate decreases the stress-induced impairment of learning and memory in rats. *Neurosci. Lett.* 602: 27-32.
- Speroni E, Cervellati R, Dall'Acqua S, Guerra MC, Greco E, Govoni P, Innocenti G. (2011). Spiller RC. (2011). Targeting the 5-HT<sub>3</sub> Receptor in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Curr Opin Pharmacol.* 11: 68-74.
- Spurny R, Debaveye S, Farinha A, Veys K, Vos AM, Gossas T, Atack J, Bertrand S, Bertrand D, Danielson UH, Tresadern G, 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 USA.* 112: 2543-2552.
- Steck TL, Ye J, Lange Y. (2002). Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. *Biophys J.* 83: 2118-2125.
- Stetzkowski-Marden F, Gaus K, Recouvreur M, Cartaud A, Cartaud J. (2006). Agrin elicits membrane lipid condensation at sites of acetylcholine receptor clusters in C2C12 myotubes. *J Lipid Res.* 47: 2121-2133.
- Stetzkowski-Marden F, Recouvreur M, Camus G, Cartaud A, Marchand S, Cartaud J. (2006). Rafts are required for acetylcholine receptor clustering. *J Mol Neurosci.* 30: 37-38.

- Sturgeon RM, Baenziger JE. (2010). Cations mediate interactions between the nicotinic acetylcholine receptor and anionic lipids. *Biophys J*. 98: 989-998.
- Sunshine C, McNamee MG. (1992). Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of neutral and negatively charged lipids. *Biochim Biophys Acta*. 1108: 240-246.
- Svennerholm L, Bostrom K, Jungbjer B, Olsson L. (1994). Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20–100 years. *J Neurochem*. 63: 1802–1811.
- Taly A, Changeux JP. (2008). Functional organization and conformational dynamics of the nicotinic receptor: a plausible structural interpretation of myasthenic mutations. *Ann NY Acad Sci*. 1132: 42-52.
- Tamamizu S, Guzmán GR, Santiago J, Rojas LV, McNamee MG, Lasalde-Dominicci JA. (2000). Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the alpha M4 transmembrane domain of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*. 39: 4666-4673.
- Tapiola T, Pirttilä T, Mehta PD, Alafuzoff I, Lehtovirtam M, Soininen H. (2000). Relationship between apoE genotype and CSF beta-amyloid (1-42) and tau in patients with probable and definite Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21: 735-740.
- Terry A V., Callahan PM, Bertrand D. (2015). R-(+) and S-(-) Isomers of Cotinine Augment Cholinergic Responses In Vitro and In Vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 352: 405-418.
- Terzi E, Hölzemann G, Seelig J. (1997). Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes. *Biochemistry* 36: 14845-14852.
- The effect of S-(+)-boldine on the alpha 1-adrenoceptor of the guinea-pig aorta. *Br J Pharmacol*. 119: 1305-1312.
- Thompson AJ, Lester HA, Lummis SC. (2010). The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q Rev Biophys*. 43: 449-499.
- Thompson AJ, Lochner M, Lummis SC. (2007). The antimalarial drugs quinine, chloroquine and mefloquine are antagonists at 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Br J Pharmacol*. 151: 666-677.
- Thompson AJ. (2013). Recent developments in 5-HT<sub>3</sub> receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 34: 100-109.
- Thompson AJ, Lummis SC. (2007). The 5-HT<sub>3</sub> receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. 11: 527-540.
- Tong M, Arora K, White MM, Nichols RA. (2011). Role of key aromatic residues in the ligand-binding domain of  $\alpha 7$  nicotinic receptors in the agonist action of  $\beta$ -amyloid. *J Biol Chem*. 286: 34373-34381.
- Triska J. (1975). The Hamlyn encyclopedia of plants. Hamlyn editorial. ISBN 0-600-33545-3
- Tsuchiya H. (2017). Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals With Anesthetic Activity. *Molecules*. 22: 1369.
- Turani O, Hernando G, Corradi J, Bouzat C. (2018). Activation of *Caenorhabditis elegans* Levamisole-Sensitive and Mammalian Nicotinic Receptors by the Antiparasitic Bephenium. *Mol Pharmacol*. 94: 1270-1279.
- Turina AV, Nolan MV, Zygodlo JA, Perillo MA. (2006). Natural Terpenes: Self-Assembly and Membrane Partitioning. *Biophys Chem*. 122: 101-113.
- Unwin N. (2013). Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from *Torpedo* postsynaptic membranes. *Q Rev Biophys*. 46: 283-322.
- Unwin N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol*. 346: 967-989.
- Uteshev VV. (2014). The therapeutic promise of positive allosteric modulation of nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol*. 727: 181-185.
- van Hooff JA, Vijverberg HP. (2000). 5-HT<sub>3</sub> receptors and neurotransmitter release in the CNS: a nerve ending story?. *Trends Neurosci*. 23: 605-610.
- van Meer G. (2011). Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1: 3-5.
- Vetrivel KS, Cheng H, Kim SH, Chen Y, Barnes NY, Parent AT, Sisodia SS, Thinakaran G. (2005). Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J Biol Chem*. 280: 25892-25900
- Victor KD, Pascual V, Lefvert AK, Capra JD. (1992). Human antiacetylcholine receptor antibodies use variable gene segments analogous to those used in autoantibodies of various specificities. *Mol Immunol*. 29: 1501-1506.
- Villar del Fresno AM, Gómez-Serranillos MP. (2006). Boldo: indicaciones terapéuticas. *Rev Fitofarmacía*. 20: 74-78.

- Wallace TL, Bertrand D. (2013). Alpha7 neuronal nicotinic receptors as a drug target in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets*. 17: 139-155.
- Wallace TL, Porter RH. (2011). Targeting the nicotinic alpha7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease. *Biochem Pharmacol*. 82: 891-903.
- Walstab J, Rappold G, Niesler B. (2010). 5-HT(3) receptors: role in disease and target of drugs. *Pharmacol Ther*. 128: 146-169.
- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. (2000). Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem*. 75: 1155-1161.
- Wang HY, Lee DHS, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. (2000) b-amyloid1-42 binds to a7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem*. 275: 5626-5632.
- Wang H-Y. (2000). beta -Amyloid1-42 binds to alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor with High Affinity. IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE PATHOLOGY. *J Biol Chem*. 275: 5626-5632.
- Werner FM, Covenas R. (2016). Serotonergic Drugs: Agonists/Antagonists at Specific Serotonergic Subreceptors for the Treatment of Cognitive, Depressant and Psychotic Symptoms in Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des*. 22: 2064-2071.
- Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. (1981). Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol*. 10: 122-126.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 215: 1237-1239.
- Whitehouse PJ. (1986). Understanding the etiology of Alzheimer's disease. Current approaches. *Neurol Clin*. 4: 427-437.
- Willmann R, Pun S, Stallmach L, Sadasivam G, Santos AF, Caroni P, Fuhrer C. (2006). Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *EMBO J*. 25: 4050-4060.
- Wood WG, Cornwell M, Williamson LS. (1989). High performance thin-layer chromatography and densitometry of synaptic plasma membrane lipids. *J Lipid Res*. 30: 775-7799.
- Wood WG, Schroeder F, Igbavboa U, Avdulov NA, Chochina SV. (2002). Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiol Aging*. 23: 685-694.
- Wood WG, Schroeder F, Igbavboa U, Avdulov NA, Chochina SV. (2002). Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiol Aging*. 23: 685-94.
- Wood WG, Li L, Müller WE, Eckert GP. (2014). Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem*. 129: 559-572.
- Wu J, Kuo Y-PP, George AA, Xu L, Hu J, Lukas RJ. (2004).  $\beta$ -Amyloid Directly Inhibits Human  $\alpha$ 4 $\beta$ 2-Nicotinic Acetylcholine Receptors Heterologously Expressed in Human SH-EP1 Cells *J Biol Chem*. 279: 37842-37851.
- Xie HQ, Wing Leung K, Chen VP, Chan GKL, Xu SL, Guo AJY, Zhu KY, Zheng KYZ, Bi CW, Zhan JYX, Chan WKP, Choi RCY, Tsim KWK. (2010a). Chemico-Biological Interactions PRiMA directs a restricted localization of tetrameric AChE at synapses. *Chem Biol Interact*. 187: 78-83.
- Xie HQ, Liang D, Leung KW, Chen VP, Zhu KY, Chan WKB, Choi RCY, Massoulié J, Tsim KWK. (2010b). Targeting Acetylcholinesterase to Membrane Rafts a function mediated by the proline-rich membrane anchor (PRiMA) in neurons. *J Biol Chem*. 285: 11537-11546.
- Xiu X, Puskar NL, Shanata JAP, Lester HA, Dougherty DA. (2009). Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation- $\pi$  interaction. *Nature*. 458: 534-537.
- Xu K, Xu YH, Chen JF, Schwarzschild MA. (2010). Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson Disease. *Neurosci* 167: 475-481.
- Xu K, Di Luca DG, Orrú M, Xu Y, Chen JF, Schwarzschild MA. (2016). Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of Parkinson's disease and its dependence on adenosine A2A receptors. *Neurosci*. 322: 129-137.
- Xu X, London E. (2000). The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*. 39: 843-849.
- Yadav RS, Tiwari NK. (2014). Lipid integration in neurodegeneration: an overview of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 50: 168-176.

- Yadav RS, Tiwari NK. (2014). Lipid integration in neurodegeneration: an overview of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 50: 168-176.
- Yamamoto T, Hirano A. (1985). Hirano bodies in the perikaryon of the Purkinje cell in a case of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 67: 167-169.
- Yan H, Pan N, Xue F, Zheng Y, Li C, Chang Y, Xu Z, Yang H, y Zhang J. (2015). The coupling interface and pore domain codetermine the single-channel activity of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor. *Neuropharmacology.* 95: 448–58.
- Yandouzi EH, Le Grimellec C. (1993). Effect of cholesterol oxidase treatment on physical state of renal brush border membranes: evidence for a cholesterol pool interacting weakly with membrane lipids. *Biochemistry.* 32: 2047-2052.
- 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.
- Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, Vardar-Sukan F. (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum Nutr.* 65: 158–163.
- Young GT, Zwart R, Walker AS, Sher E, Millar NS. (2008). Potentiation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 14686-14691.
- Yu W, So PT, French T, Gratton E. (1996). Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach. *Biophys J.* 70: 626-636.
- Yu Y, Shi L, Karlin A. (2003). Structural effects of quinacrine binding in the open channel of the acetylcholine receptor. *PNAS.* 100: 3907-3912.
- Zhang G, Liu H, Yang L. Zhong YG, Zheng YZ. (2000). Influence of Membrane Physical State on the Lysosomal Proton Permeability. *Membrane Biol.* 175: 53–62.
- Zhang J, Xue F, Liu Y, Yang H, Wang X. (2013). The structural mechanism of the Cys-loop receptor desensitization. *Mol Neurobiol.* 48: 97-108.
- Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3.
- Zhao J, Wu J, Heberle FA, Mills TT, Klawitter P, Huang G, Costanza G, Feigenson GW. (2007). Phase studies of model biomembranes: complex behavior of DSPC/DOPC/cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1768: 2764-2776.
- Zhong W, Gallivan JP, Zhang Y, Li L, Lester HA, Dougherty DA. (1998). From *ab initio* quantum mechanics to molecular neurobiology: A cation- $\pi$  binding site in the nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 12088–12093.
- Zhu D, Xiong WC, Mei L. (2006). Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J Neurosci.* 26: 4841-4851.
- Ziamba PM, Schreiner BS, Flegel C, Herbrechter R, Stark TD, Hofmann T, Hatt H, Werner M, Gisselmann G. (2015). Activation and modulation of recombinantly expressed serotonin receptor type 3A by terpenes and pungent substances. *Biochem Biophys Res Commun.* 467: 1090-1096.
- Zimmermann H. (1979). Vesicle recycling and transmitter release. *Neuroscience* 4: 1773-1804.
- Zong Y, Zhang B, Gu S, Lee K, Zhou J, Yao G, Figueiredo D, Perry K, Mei L, Jin R. (2012). Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling. *Genes Dev.* 26: 247-258.

## ABREVIATURAS

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina, serotonina.

**ACE:** acetilcolinesterasa.

**ACh:** acetilcolina.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario.

**APP:** proteína precursora amiloide.

**A $\beta$ :** péptidos beta amiloide.

**BD:** *Buffer* de diálisis (NaCl 100 mM, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, Na<sub>3</sub>N 0,02 %, pH 7,8).

**BE:** *Buffer* de elución (NaCl 250 mM, EDTA 0,1 mM, Na<sub>3</sub>N 0,02 %, fosfato 5 mM, pH 7,8, con colato 0,5 % y carbamilcolina (carb) 10 mM).

**BH:** *Buffer* de homogeneización (*Buffer* de fosfato de sodio 10 mM pH 7,4, NaCl 0,4 M, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 3 mM y Na<sub>3</sub>N 0,02 % (p/v)).

**bSM:** *brain sphingomyelin*, esfingomiélinea de cerebro.

**C:** cerrado, referido al estado cerrado del receptor nAChR.

**carb:** carbamilcolina.

**CAS:** sitio catalítico.

**CHEMS:** colesterol hemisuccinato.

**Col:** colesterol.

**Cox:** colesterol oxidasa.

**CrV:** cristal violeta.

**DCM:** diclorometano.

**DMEM:** Dubecco's modified Eagle's médium, medio de Eagle modificado por Dubecco.

**DMF:** dimetilformamida.

**DMSO:** dimetilsulfóxido.

**DPH:** 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno.

**DPPC:** dipalmitoilfosfatidilcolina.

**DRM:** fracciones de membrana resistentes a detergentes.

**DSM:** fracciones de membrana solubles en detergentes.

**DTNB:** 5'5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico).

**DTT:** ditioneitol.

**EA:** enfermedad de Alzheimer.

**EC<sub>50</sub>:** *half maximal effective concentration*, concentración media máxima eficaz.

**ECD:** dominio intracelular.

**eSM:** *egg sphingomyelin*, esfingomiélinea de huevo.

**FRAP:** Fluorescence recovery after photobleaching, recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo.

**GFP:** proteína verde fluorescente.

**GP:** polarización generalizada.

**GUVs:** vesículas unilamelares gigantes.

**HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico.

**IC<sub>50</sub>:** *half maximal inhibitory concentration*, concentración inhibitoria media máxima.

**ICD:** dominio intracelular.

**KD:** constante de disociación.

**Ld:** dominio líquido-desordenado.

**LGIC:** canales iónicos activados por ligando.

**Lo:** dominio líquido-desordenado.

**LUVs:** vesículas unilamelares grandes.

**MIL:** máximo intervalo de probabilidad.

**MLVs:** vesículas multilamelares.

**MuSK:** tirosina quinasa específica de músculo.

**nAChR:** *nicotinic acetylcholine receptor*, receptor nicotínico de acetilcolina.

**O:** *open*, referido al estado abierto del nAChR.

**PAMs:** moduladores alostéricos positivos.

**PAS:** sitio aniónico periférico.

**PBS:** *Phosphate-buffered saline*, buffer fosfato salino.

**PC:** fosfatidilcolina.

**PE:** fosfatidiletanolamina.

**PNU:** PNU-120596, N-(5-Chloro-2,4- dimethoxyphenyl)-N'-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea.

**POPC:** palmitoil-oleil-fosfatidilcolina.

**PUFAs:** ácidos grasos poliinsaturados.

**R:** reposo, referido al estado de reposo del nAChR.

**r:** anisotropía de fluorescencia.

**Receptores 5-HT<sub>3</sub>:** receptores de serotonina de tipo 3.

**Receptores 5-HT<sub>3A</sub>:** receptor de serotonina de tipo 3 homomérico formado por 5 subunidades A.

**Receptores 5-HT<sub>3AHC</sub>:** receptor de serotonina de tipo 3 homomérico formado por 5 subunidades A, de alta conductancia.

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SM:** esfingomiolina.

**SNC:** sistema nervioso central.

**SNP:** sistema nervioso periférico.

**TCA:** ácido tricloroacético.

**TLC:** cromatografía en capa fina.

**TM1-TM4:** segmentos que componen el dominio transmembrana de los receptores *Cys-loop*.

**TMA-DPH:** (4-Trimetilamoniofenil)-6-difenil-1,3,5-hexatrieno.

**TMD:** dominio transmembrana.

**TNBS:** ácido trinitrobenceno-sulfónico.

**$\alpha$ -BTX:**  $\alpha$ -bungarotoxina.

**$\gamma$ TM4:** péptido correspondiente a segmento TM4 de la subunidad  $\gamma$  de los receptores *Cys-loop*.

**$\tau_{10-90}$ :** tiempo que transcurre entre el 10 % y el 90 % del máximo de corriente.

**$\tau_{crit}$ :** tiempo crítico.

## Publicaciones

- **Fabiani C**, Murray A.P, Corradi J, Antollini S.S. (2018). A novel pharmacological activity of caffeine in the cholinergic system. *Neuropharmacology* 135:464-473.
- **Fabiani C**, Antollini S.S. (2019). Alzheimer's Disease as a Membrane Disorder: Spatial Cross-Talk Among Beta-Amyloid Peptides, Nicotinic Acetylcholine Receptors and Lipid Rafts. *Front Cell Neurosci.* 18:13-309.
- Lasala M, **Fabiani C**, Corradi J, Antollini S, Bouzat C. (2019). Molecular Modulation of Human  $\alpha 7$  Nicotinic Receptor by Amyloid- $\beta$  Peptides. *Front Cell Neurosci.* 8:13-37.
- Rodriguez Araujo N\*, **Fabiani C\***, Mazzarini Dimarco A, Bouzat C, Corradi J. (2020). Orthosteric and Allosteric Activation of Human 5-HT<sub>3A</sub> Receptors. *Biophys J.* 119(8):1670-1682.  
\* *Primera autoría compartida.*
- **Fabiani C**, Biscussi B, Munafó J.P, Corradi J, Murray A.P, Antollini S.S. Synthesis and functional evaluation of new analogs of caffeine as modulators of the cholinergic system. *En proceso de escritura.*