



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA

Modulación de las Funciones Ionotrópica y Metabotrópica del Receptor Nicotínico de Acetilcolina $\alpha 7$ Humano

Juan Facundo Chrestia



BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el septiembre de 2017 y mayo 2023, bajo la dirección de la Doctora Cecilia Bouzat, Investigadora Superior de CONICET, Directora del INIBIBB y Profesora Titular de la Cátedra de Farmacología II, y bajo la codirección de la Doctora María del Carmen Esandi, Profesora Titular de la Cátedra de Genética Molecular.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Sur, por permitirme la formación de grado y postgrado; y a la Escuela de Agricultura y Ganadería, donde completé mis estudios secundarios, pero más importante aún, donde empezó mi pasión por las ciencias biológicas y por la investigación. Sin lugar a duda “Agricu” y su gente marcó mi vida y mi profesión.

Al CONICET por brindarme los recursos económicos para poder desarrollar esta tesis.

Al INIBIBB y a todos sus integrantes, presentes y pasados, quienes de algún modo u otro formaron parte de este camino que empecé a transitar como alumno de grado. A Leo y Carmen por ayudarme a dar los primeros pasos en investigación. A Ceci y Carmen por confiar en mí para desarrollar la tesis bajo su dirección, por enseñarme, aconsejarme, ayudarme, acompañarme y guiarme durante estos hermosos años de aprendizaje. A todos mis compañeros del laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular por su ayuda y compañía en el día a día; a los integrantes del “Luigi Vagnoni Team” por tener siempre buenas energías, hacerme reír mucho y ponerse firmes con el “Lunes Dulce”; a Nacho, Flor, Marta, Carla, Pablo y Edgardo por su ayuda constante y por las charlas diarias; y en especial a Vivi, por todo lo que me ha enseñado y ayudado, por compartir el amor por la lectura, pero más importante aún, por su amistad.

A todos mis compañeros de “Anátomo”, “Episte” y “Fisio” con quienes compartí y comparto la docencia universitaria, tarea que disfruto enormemente, y de la cual me enriquezco continuamente.

A todos mis amigos...de la vida, de la escuela, de la “Uni”, de “La Plaza” y de “Paleta”; por estar siempre, escucharme, aconsejarme y alentarme constantemente... por su amistad.

Por último y más importante, quiero agradecer a mi familia que incondicionalmente me brindan su amor y apoyo, que son parte de mi vida y felicidad. A mis padres, Mary y Luis, que me dieron la vida y desde el ejemplo me enseñaron todo. Lo que soy, se los debo a ellos. A mis hermanas, Mari y Manu, por estar siempre que las necesité y quererme como soy. Y por último a Flor, mi compañera de viaje, y de viajes. Gracias por darme tu amor, por no dejarme bajar los brazos, por escucharme y aconsejarme, por compartir el camino juntos y hacerme tan feliz.

MODULACIÓN DE LAS FUNCIONES IONOTRÓPICA Y METABOTRÓPICA DEL RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA $\alpha 7$ HUMANO

RESUMEN

La supervivencia de los organismos superiores depende de que sus células se organicen y actúen de manera sincronizada para cumplir funciones específicas, para lo cual es fundamental la comunicación intercelular. Este proceso es básico para la vida de todas las células, pero es la razón de ser en las neuronas que están especializadas en recibir información, procesarla y comunicarla a otras células. En el sistema nervioso, la principal forma de comunicación se realiza a través de la sinapsis química, en la que una neurona libera un mensajero químico, el neurotransmisor, que es reconocido por un receptor presente en otra célula permitiéndole responder al mensaje.

La acetilcolina es uno de los principales neurotransmisores utilizados por las neuronas, y sus receptores, tanto metabotrópicos como ionotrópicos, están expresados en muchos tipos celulares. Los receptores ionotrópicos de acetilcolina, llamados receptores nicotínicos, son canales catiónicos pentaméricos que pertenecen a la familia de receptores *Cys-loop*.

El receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ es un homopentámero que exhibe propiedades funcionales particulares fundamentales para su rol neuromodulador, incluyendo la elevada permeabilidad al Ca^{2+} y la capacidad para transformar respuestas ionotrópicas transitorias en eventos más sostenidos de señalización metabotrópica. Es uno de los receptores nicotínicos más abundantes en el sistema nervioso, aunque también se encuentra presente en otros tejidos. En el sistema nervioso central cumple un rol importante en procesos de cognición, atención y memoria, al regular la liberación de neurotransmisores, mediar la transmisión sináptica rápida y modular la excitabilidad neuronal. Una disminución de su actividad se ha asociado con diversos desórdenes neurológicos y neurodegenerativos, incluyendo esquizofrenia, autismo y enfermedad de Alzheimer. El receptor $\alpha 7$ también se expresa en células no neuronales, tales como -entre

otras-, los astrocitos, la microglía, los linfocitos B y T, las células epiteliales, los macrófagos, cumpliendo un rol importante en inmunidad, inflamación y neuroprotección.

Las acciones neuromoduladoras, neuroprotectoras y antiinflamatorias sistémicas del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ junto a sus propiedades únicas de activación, desensibilización, permeabilidad al Ca^{2+} y rol dual ionotrópico-metabotrópico, lo han convertido en un blanco farmacológico emergente muy importante en diversos desórdenes neurológicos, neurodegenerativos e inflamatorios.

Este trabajo de tesis se basó en el estudio de los aspectos moleculares relacionados a diferentes tipos de modulación de las funciones ionotrópicas y metabotrópicas del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ humano. Para ello se utilizaron principalmente técnicas electrofisiológicas a nivel de canal único y de corrientes macroscópicas, en conjunto con análisis de proteínas por *western blot* y ensayos de movimiento de Ca^{2+} intracelular.

El capítulo I se centró en el estudio de la modulación de las funciones ionotrópicas y metabotrópicas del receptor $\alpha 7$ por eventos de fosforilación/desfosforilación. Se demostró que favorecer el estado desfosforilado de las tirosinas del dominio intracelular de $\alpha 7$ potencia la actividad ionotrópica del receptor. A nivel de corrientes unitarias, el efecto potenciador involucró un aumento en la frecuencia y duración de los episodios de activación, mientras que a nivel de corrientes macroscópicas se manifestó por una disminución en la velocidad de decaimiento de la corriente, y un aumento en la tasa de recuperación desde el estado desensibilizado. Por el contrario, la desfosforilación de las tirosinas tuvo un efecto negativo en la actividad metabotrópica del receptor, estudiada por *western blot* a partir de la vía de ERK 1/2. Además, a diferencia de lo observado para las tirosinas, las alteraciones en el estado de fosforilación de serinas y treoninas del dominio intracelular no ocasionaron cambios importantes en la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ en las condiciones experimentales aquí utilizadas. En síntesis, los resultados presentados en este capítulo ponen en evidencia que la fosforilación de las tirosinas, si bien es absolutamente necesaria para la actividad metabotrópica de $\alpha 7$ mediada por la vía ERK 1/2, actúa como un modulador negativo de la actividad ionotrópica del receptor.

El capítulo II abordó el estudio de la asociación funcional entre un fragmento peptídico de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 (Y674-R685) y el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ humano. La asociación entre SARS-CoV-2 y los receptores nicotínicos fue propuesta en forma de hipótesis al comienzo de la pandemia. Más adelante, simulaciones

de dinámica molecular mostraron que el fragmento Y674-R685 no solo tiene afinidad por $\alpha 7$, sino que penetra profundamente en el bolsillo de unión a agonista del receptor. En este capítulo, en primer lugar, se demostró que el fragmento Y674-R685 actúa como un agonista silente de $\alpha 7$, ya que es capaz de provocar corrientes unitarias y macroscópicas del receptor, pero solo en presencia de un modulador alostérico positivo. Por otro lado, se demostró que Y674-R685 también ejerce una modulación negativa de $\alpha 7$, que se evidenció por una profunda disminución, dependiente de la concentración, en la duración de los episodios de activación de los canales potenciados y en la amplitud de las respuestas macroscópicas provocadas por la acetilcolina. De esta manera, utilizando distintos enfoques electrofisiológicos, se develó la existencia de una interacción funcional entre el fragmento Y674-R685 de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 y el receptor $\alpha 7$ que proporciona las bases moleculares para seguir explorando la participación de los receptores nicotínicos en la fisiopatología de la COVID-19.

El capítulo III se basó en el estudio del receptor $\alpha 7$ como blanco del cannabidiol, lo cual resulta de gran interés debido al uso expandido de este fitocannabinoide para tratar diferentes condiciones patológicas gracias a sus propiedades terapéuticas y a la ausencia de efectos psicoactivos. Para ello se exploró el efecto del cannabidiol en las funciones ionotrópicas y metabotrópicas de $\alpha 7$ mediante técnicas electrofisiológicas y ensayos de movimiento de Ca^{2+} intracelular. En lo que respecta a las funciones ionotrópicas, se demostró que el cannabidiol produce una rápida disminución de la actividad del canal a nivel de corrientes unitarias evidenciada por la reducción en la frecuencia de los episodios de activación. Este efecto fue dependiente de la concentración y se dio con una CI_{50} en el rango submicromolar, lo que indica una potente modulación negativa. Por otra parte, el cannabidiol también produjo una modulación negativa en la función metabotrópica de $\alpha 7$ que se evidenció por una marcada disminución en las respuestas de Ca^{2+} intracelular tras la activación del receptor. Estos resultados demuestran que el cannabidiol ejerce una modulación negativa de $\alpha 7$ de relevancia farmacológica que debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar los posibles usos terapéuticos del fitocannabinoide.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis amplían el entendimiento de los aspectos moleculares relacionados con la modulación de las funciones ionotrópicas y metabotrópicas del receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ en distintas condiciones, a saber, fisiológicas (eventos de fosforilación/desfosforilación), patológicas (fragmento peptídico derivado de la glicoproteína S del SARS-CoV-2) y terapéuticas (cannabidiol).

MODULATION OF HUMAN $\alpha 7$ NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR IONOTROPIC AND METABOTROPIC FUNCTIONS

SUMMARY

The survival of higher organisms depends on the ability of their cells to be well organized and to behave in a synchronized manner to fulfill specific functions for which intercellular communication is of pivotal importance. This process is basic for the life of all cells, but it is the *raison d'être* in neurons that are specialized in receiving information, processing it, and communicating it to other cells. In the nervous system, the main form of communication is carried out via the chemical synapse, in which a neuron releases a chemical messenger, the neurotransmitter, which is identified by a receptor present in another cell, allowing it to respond to the message.

Acetylcholine is one of the main neurotransmitters used by neurons, and its receptors, both metabotropic and ionotropic, are expressed in many cell types. Ionotropic acetylcholine receptors, called nicotinic receptors, are pentameric cation channels belonging to the *Cys-loop* receptor family.

The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor is a homopentamer with particular functional properties critical to its neuromodulatory role, including high Ca^{2+} permeability and the ability to transform transient ionotropic responses into more sustained metabotropic signaling events. It is one of the most abundant nicotinic receptors in the nervous system, although it is also present in other tissues. In the central nervous system, it plays an important role in cognition, attention, and memory, by regulating the release of neurotransmitters, mediating rapid synaptic transmission, and modulating neuronal excitability. A decrease in $\alpha 7$ activity has been associated with various neurological and neurodegenerative disorders, such as schizophrenia, autism, and Alzheimer's disease. The $\alpha 7$ receptor is also expressed in non-neuronal cells; namely, astrocytes, microglia, B and T lymphocytes, epithelial cells, and macrophages, and plays an important role in immunity, inflammation, and neuroprotection.

The neuromodulatory, neuroprotective, and systemic anti-inflammatory actions of $\alpha 7$, together with its unique activating, desensitizing, Ca^{2+} permeability, and dual ionotropic-metabotropic properties, have made the receptor a very important emerging drug target in various neurological, neurodegenerative, and inflammatory disorders.

This P.D. thesis work was based on the study of molecular aspects related to different types of modulation of the ionotropic and metabotropic functions of the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. To this end, electrophysiological techniques at the single channel and macroscopic current levels were mainly used, as well as protein analysis by western blot and intracellular Ca^{2+} movement assays.

Chapter I focused on the study of $\alpha 7$ receptor ionotropic and metabotropic function modulation by phosphorylation/dephosphorylation events. It was shown that favoring the dephosphorylated state of $\alpha 7$ intracellular domain tyrosine residues potentiates its ionotropic activity. At the single-channel level, this potentiating effect involved an increase in the frequency and duration of activation episodes, while at the macroscopic level it was manifested by a decrease in the rate of current decay and by an increase in the rate of recovery from the desensitized state. In contrast, tyrosine dephosphorylation had a negative effect on receptor metabotropic activity, studied by western blot from ERK 1/2 pathway. In addition, unlike what was observed for tyrosine residues, alterations in the phosphorylation status of serine and threonine residues present in the intracellular domain did not cause any significant changes in $\alpha 7$ ionotropic activity under the experimental conditions used. Summing up, the results collected in this chapter show that tyrosine phosphorylation, although it is absolutely necessary for $\alpha 7$ metabotropic activity mediated by ERK 1/2 pathway, acts as a negative modulator of receptor ionotropic activity.

Chapter II focused on the study of the functional association between a peptide fragment of SARS-CoV-2 S glycoprotein (Y674-R685) and human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. The association between SARS-CoV-2 and nicotinic receptors was hypothesized at the beginning of the pandemic. Later, molecular dynamics simulations showed that the Y674-R685 fragment not only has affinity for $\alpha 7$ but also penetrates deep into its agonist-binding pocket. In this chapter, it was firstly stated that the Y674-R685 fragment acts as a silent $\alpha 7$ agonist, since it is capable of triggering single-channel and macroscopic currents, but only in the presence of a positive allosteric modulator. On the other hand, it was shown that Y674-R685 also exerts $\alpha 7$ negative modulation, which was

evidenced by a profound concentration-dependent decrease in the duration of acetylcholine-induced activation episodes from potentiated channels and macroscopic responses. In this way, using different electrophysiological approaches, the existence of functional interaction between SARS-CoV-2 S glycoprotein Y674-R685 fragment and $\alpha 7$ receptor was revealed, which provides the molecular bases to further explore nicotinic receptor participation in COVID-19 pathophysiology.

Chapter III was based on the study of the $\alpha 7$ receptor as a target of cannabidiol, which is of great interest due to the expanded use of this phytocannabinoid to treat different pathological conditions thanks to its therapeutic properties and the absence of psychoactive effects. To this end, the effect of cannabidiol on $\alpha 7$ ionotropic and metabotropic functions was explored using electrophysiological techniques and intracellular Ca^{2+} movement assays. Regarding ionotropic functions, it was shown that cannabidiol produces a rapid decrease in single-channel activity evidenced by the reduction in activation episodes frequency. This concentration-dependent effect occurred with an IC_{50} in the submicromolar range, indicating a potent negative modulation. On the other hand, cannabidiol also produced a negative modulation in $\alpha 7$ metabotropic function that was evidenced by a marked decrease in intracellular Ca^{2+} responses after receptor activation. These results demonstrate that cannabidiol exerts $\alpha 7$ negative modulation of pharmacological relevance that must be taken into account when evaluating possible therapeutic uses of the phytocannabinoid.

Taken together, the results presented in this thesis broaden the understanding of molecular aspects related to the modulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ionotropic and metabotropic functions under different conditions, namely physiological (phosphorylation/dephosphorylation events), pathological (SARS-CoV-2 S glycoprotein fragment) and therapeutic (cannabidiol).

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | I |
| SUMMARY..... | IV |
| ÍNDICE..... | VII |
| INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 1. Mecanismos de comunicación intercelular: transmisión sináptica y extrasináptica | 2 |
| 1.1. Sistema Nervioso..... | 2 |
| 1.2. Comunicación celular..... | 3 |
| 1.2.1. Transmisión sináptica..... | 3 |
| 1.2.2. Transmisión extrasináptica..... | 5 |
| 2. Neurotransmisores | 6 |
| 2.1. Definición y generalidades..... | 6 |
| 2.2. ACh..... | 7 |
| 3. Receptores de neurotransmisores | 9 |
| 3.1. Canales iónicos pentaméricos activados por ligando..... | 11 |
| 4. Receptores nicotínicos | 13 |
| 4.1. Generalidades..... | 13 |
| 4.2. Diversidad de subunidades..... | 13 |
| 4.3. Distribución celular y funciones fisiológicas..... | 15 |
| 4.3.1. nAChR en la NMJ..... | 15 |
| 4.3.2. nAChR en el SNP..... | 16 |
| 4.3.3. nAChR en el SNC..... | 16 |
| 4.3.4. nAChR neuronales en células no neuronales..... | 18 |
| 4.4. Estructura..... | 18 |
| 4.4.1. Dominio extracelular..... | 20 |
| 4.4.2. Dominio transmembrana..... | 22 |
| 4.4.3. Región de acoplamiento..... | 24 |
| 4.4.4. Dominio intracelular..... | 24 |
| 4.5. Estados conformacionales asociados a la activación del canal..... | 27 |
| 4.6. Modulación farmacológica..... | 32 |
| 4.6.1. Ligandos ortostéricos..... | 33 |
| 4.6.1.1. <i>Agonistas ortostéricos</i> | 33 |
| 4.6.1.2. <i>Antagonistas ortostéricos (competitivos)</i> | 34 |

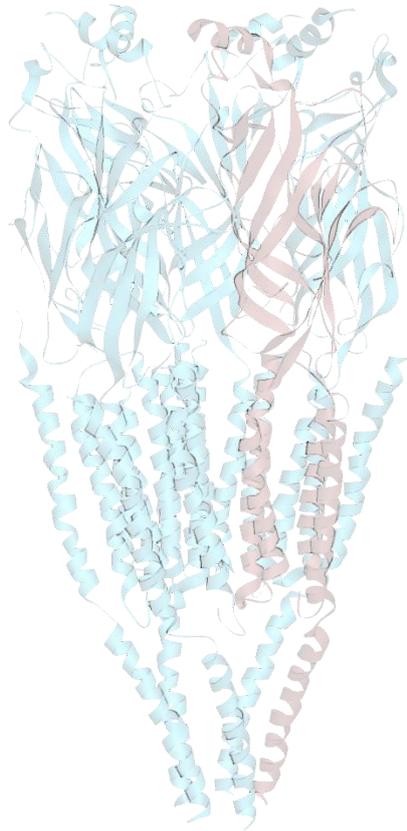
| | |
|---|-----------|
| 4.6.2. Ligandos alostéricos..... | 35 |
| 4.6.2.1. Moduladores alostéricos negativos | 35 |
| 4.6.2.2. Moduladores alostéricos positivos..... | 36 |
| 4.6.2.3. Moduladores alostéricos silentes | 37 |
| 4.6.2.4. Agonistas alostéricos | 37 |
| 5. Receptor nicotínico $\alpha 7$ | 38 |
| 5.1. nAChR $\alpha 7$ neuronal..... | 38 |
| 5.2. nAChR $\alpha 7$ extraneuronal | 39 |
| 5.3. Actividad ionotrópica y metabotrópica del nAChR $\alpha 7$ | 40 |
| 5.4. Estrategias terapéuticas que tienen como blanco el nAChR $\alpha 7$ | 43 |
| METODOLOGÍA..... | 45 |
| 1. Cultivo celular | 46 |
| 2. Subunidades salvajes y mutantes | 46 |
| 3. Expresión heteróloga de receptores | 47 |
| 4. Estudios electrofisiológicos: <i>patch-clamp</i> | 48 |
| 4.1. Configuraciones de patch-clamp..... | 48 |
| 4.2. Microelectrodos | 50 |
| 4.3. Equipamiento..... | 51 |
| 4.4. Registros de canal único: configuraciones cell-attached e inside-out..... | 52 |
| 4.4.1. Soluciones | 52 |
| 4.4.2. Obtención de los registros y análisis de las corrientes unitarias | 53 |
| 4.5. Registros de corrientes macroscópicas: configuración whole-cell..... | 55 |
| 4.5.1. Soluciones | 55 |
| 4.5.2. Obtención de los registros y análisis de las corrientes macroscópicas | 55 |
| 5. Análisis de proteínas: <i>western blot</i> | 57 |
| 6. Movimientos de Ca^{2+} intracelular | 57 |
| 7. Ensayos electrofisiológicos en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> | 58 |
| 7.1. Expresión de $\alpha 7$ en ovocitos de <i>X. laevis</i> | 59 |
| 7.2. Registros electrofisiológicos en ovocitos de <i>X. laevis</i> | 59 |
| 8. Drogas utilizadas..... | 60 |
| 9. Análisis estadístico | 61 |
| CAPÍTULO I..... | 62 |
| MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN IONOTRÓPICA Y METABOTRÓPICA DE $\alpha 7$ POR EVENTOS DE FOSFORILACIÓN/DESFOSFORILACIÓN..... | 62 |
| INTRODUCCIÓN | 63 |
| 1. Modificaciones postraduccionales de proteínas..... | 63 |

| | |
|---|----|
| 2. Fosforilación de proteínas..... | 63 |
| 3. Fosforilación de pLGIC | 65 |
| 4. Fosforilación de los nAChR..... | 66 |
| 4.1. Fosforilación de los nAChR de la NMJ..... | 66 |
| 4.1.1. Efecto de la fosforilación de los nAChR en la formación y estabilidad de la NMJ | 66 |
| 4.1.2. Efecto de la fosforilación de los nAChR en la función de los receptores en la NMJ madura | 67 |
| 4.2. Fosforilación de los nAChR de neuronas del SNP | 68 |
| 4.3. Fosforilación de los nAChR de neuronas del sistema SNC | 68 |
| 4.3.1. Fosforilación de los nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ | 69 |
| 4.3.2 Fosforilación de los nAChR $\alpha 7$ | 70 |
| OBJETIVOS..... | 72 |
| RESULTADOS | 74 |
| 1. Efecto de la fosforilación/desfosforilación de Tyr en el ICD de $\alpha 7$ sobre la función del receptor | 74 |
| 1.1. Perfil cinético de $\alpha 7$ a nivel de canal único..... | 74 |
| 1.2. La inhibición de la fosforilación de Tyr aumenta la duración y la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ | 76 |
| 1.2.1. La inhibición de las SFK aumenta la duración de los episodios de activación de $\alpha 7$ | 76 |
| 1.2.2. La inhibición de las SFK aumenta la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ | 78 |
| 1.2.3. La coexpresión de $\alpha 7$ y la quinasa Src inactiva incrementa la duración de los <i>bursts</i> del receptor | 81 |
| 1.3. La inhibición de la desfosforilación de fosfotirosinas disminuye la duración de los episodios de activación de $\alpha 7$ | 82 |
| 1.4. El receptor $\alpha 7$ mutante que carece de Tyr fosforilables en el ICD tiene episodios de activación de mayor duración que el receptor salvaje | 84 |
| 1.5. La fosforilación de las Tyr del ICD de $\alpha 7$ favorece el estado desensibilizado del receptor | 88 |
| 1.6. La fosforilación de las Tyr del ICD está involucrada en las respuestas metabotrópicas de $\alpha 7$ | 91 |
| 2. Efecto de la fosforilación/desfosforilación de Ser/Thr en el ICD de $\alpha 7$ sobre la función del receptor..... | 92 |
| 2.1. Efectos de la activación e inhibición de PKA en la duración y frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ | 93 |
| 2.2. Efectos de la activación e inhibición de PKC en la duración y frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ | 96 |

| | |
|---|-----|
| 2.3. Los mutantes de $\alpha 7$ en Ser y Thr potencialmente fosforilables tienen el mismo perfil cinético que el receptor salvaje | 100 |
| DISCUSIÓN..... | 101 |
| CAPÍTULO II | 109 |
| MODULACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha 7$ POR EL FRAGMENTO Y674-R685 DE LA GLICOPROTEÍNA S DEL SARS-CoV-2 | 109 |
| INTRODUCCIÓN..... | 110 |
| 1. Enfermedad por Coronavirus 2019 | 110 |
| 2. SARS-CoV-2 | 111 |
| 3. Asociación entre el SARS-CoV-2 y los nAChR | 115 |
| OBJETIVOS..... | 118 |
| RESULTADOS | 119 |
| 1. Activación del nAChR $\alpha 7$ por el fragmento Y674-R685 de la proteína S del SARS-CoV-2 | 119 |
| 1.1. El fragmento Y674-R685 es incapaz de activar al receptor $\alpha 7$ | 119 |
| 1.2. El fragmento Y674-R685 es capaz de activar a $\alpha 7$ en presencia de PAM..... | 120 |
| 1.2.1. El péptido Y674-R685 activa a $\alpha 7$ en presencia de PNU-120596..... | 121 |
| 1.2.2. El péptido Y674-R685 activa a $\alpha 7$ en presencia de 5-HI | 127 |
| 2. Inhibición de la actividad de $\alpha 7$ por el fragmento peptídico Y674-R685 de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 | 130 |
| DISCUSIÓN..... | 139 |
| CAPÍTULO III..... | 147 |
| MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR $\alpha 7$ POR CANNABIDIOL..... | 147 |
| INTRODUCCIÓN | 148 |
| 1. <i>Cannabis sativa</i> , fitocannabinoides y sistema endocannabinoide | 148 |
| 2. Uso terapéutico de los cannabinoides | 149 |
| 3. Acciones del CBD independiente de los CBR..... | 150 |
| 4. Los pLGIC como blancos de los cannabinoides..... | 150 |
| OBJETIVOS..... | 153 |
| RESULTADOS | 154 |
| 1. Efecto del CBD en la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ a nivel de canal único | 154 |
| 1.1. El CBD modifica el patrón de activación de $\alpha 7$ a nivel de canal único..... | 154 |
| 1.1.1. Disminución de la frecuencia de episodios de activación de $\alpha 7$ por CBD . | 155 |
| 1.1.2. Cambios en la duración y amplitud de los episodios de activación de $\alpha 7$ por CBD | 158 |
| 1.1.3. ¿Son reversibles los efectos de CBD en la frecuencia y cinética de los episodios de activación de $\alpha 7$? | 163 |

| | |
|--|-----|
| 1.2. El CBD disminuye la actividad de $\alpha 7$ activado por ACh y potenciado por distintos PAM | 164 |
| 1.3. La actividad de distintos mutantes de $\alpha 7$ se ve inhibida por el CBD | 166 |
| 1.4. Las corrientes unitarias de $\alpha 7$ son inhibidas desde su cara intracelular por el CBD | 169 |
| 2. Efecto del THC en la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ a nivel de canal único | 170 |
| 3. Efecto del CBD en la movilización intracelular de Ca^{2+} producida tras la activación de $\alpha 7$ | 172 |
| DISCUSIÓN | 175 |
| BIBLIOGRAFÍA | 185 |
| ABREVIATURAS Y SIGLAS | 223 |
| PUBLICACIONES | 227 |
| 1. Trabajos publicados en revistas científicas | 227 |
| 2. Capítulos de libros | 227 |

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. Mecanismos de comunicación intercelular: transmisión sináptica y extrasináptica

1.1. Sistema Nervioso

Si bien desde comienzos del siglo XIX se sabe que las células constituyen los elementos básicos de los organismos, no fue hasta el siglo XX en que se concordó que el tejido nervioso también estaba compuesto por estas unidades fundamentales individuales. Las distintas formas de las células nerviosas y la gran extensión de algunas de sus proyecciones dificultaban a los científicos a establecer semejanzas con células de otros tejidos, por lo que muchos años prevaleció la “teoría reticular” que establecía que cada célula nerviosa estaba conectada a sus vecinas por un retículo de conexiones protoplasmáticas. Esta teoría fue refutada por los trabajos de Santiago Ramón y Cajal que, mediante microscopía óptica y tinción del tejido nervioso con sales argénticas, demostró que las células nerviosas eran entidades separadas y no un sincitio. Siguiendo esta idea, Charles Scott Sherrington introdujo el concepto de “sinapsis” para describir una región de discontinuidad entre neuronas donde podría ocurrir la comunicación entre ellas (Levine, 2007; Purves et al., 2001).

El sistema nervioso (SN) está formado por células que se dividen en dos grandes grupos: (i) las neuronas o células nerviosas; y (ii) las células de sostén o células gliales. Las neuronas son células especializadas en la señalización eléctrica, mientras que las células gliales tienen un rol de soporte metabólico y mantenimiento de un entorno óptimo para asegurar una correcta señalización eléctrica por las neuronas. Se estima que en el encéfalo humano hay 100000 millones de neuronas y, tal vez, tres veces más células gliales.

El SN se subdivide, desde un punto de vista estructural, en un componente central y otro periférico. El sistema nervioso central (SNC) comprende el encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco encefálico) y la médula espinal. El sistema nervioso periférico (SNP) incluye neuronas sensitivas que conectan el SNC con los receptores sensitivos y neuronas motoras que conectan el SNC con los efectores (músculos y glándulas). La división motora del SNP se divide en somática, si el efector es músculo esquelético, y autónoma, si el efector es músculo liso, cardíaco o glándula (Purves et al., 2001).

1.2. Comunicación celular

La vida de los organismos pluricelulares consiste en una continua respuesta y adaptación tanto al medio externo como al medio interno. Las células tienen que percibir señales de lo que sucede en el exterior, pero también deben conocer la situación de las demás células del organismo para que sus respuestas sean acordes a las circunstancias. La supervivencia de los organismos superiores depende, en gran medida, de que sus células se organicen y actúen de manera sincronizada en órganos y tejidos para que los mismos cumplan sus funciones específicas. La comunicación celular es el proceso por el cual las células transmiten información a distancias significativamente variables para promover o modificar respuestas en otras células.

Si bien la comunicación celular es un proceso básico para la vida de toda célula, en la neurona la comunicación es su razón de ser. Los fenómenos de comunicación celular están detrás de todos los procesos del SN, desde la conducción de impulsos por una cadena neuronal hasta los sofisticados cambios que dan lugar al conocimiento, al aprendizaje y a la memoria. En el SNC se describen dos formas amplias de comunicación intercelular: (i) transmisión sináptica clásica o *wired-transmission*; y (ii) transmisión extrasináptica o *volume-transmission* (Agnati et al., 2010; Guidolin et al., 2022).

1.2.1. Transmisión sináptica

La sinapsis se define como la estructura que permite el contacto funcional para el pasaje de información entre una neurona y otra célula. Si la segunda célula es una neurona la sinapsis se denomina interneuronal, pero si es otro tipo celular (muscular, glandular) se la llama sinapsis neuroefectora. El proceso de comunicación directo y eficiente que es mediado por una sinapsis se conoce como transmisión sináptica. En el SN las sinapsis pueden ser de tres tipos: (i) eléctricas, (ii) químicas, y (iii) mixtas.

En la sinapsis eléctrica existe un contacto físico entre neuronas dado por uniones en hendidura (*gap junctions*), que son canales, llamados conexones, formados por proteínas (conexinas), a través de los cuales transitan libremente agua, pequeños iones y moléculas. Por ello, la señal eléctrica es capaz de pasar directamente de una célula a la siguiente sin necesidad de mediación química. Gracias a esto, la sinapsis eléctrica ofrece una vía de baja resistencia entre neuronas, con un retraso mínimo en la transmisión del mensaje. La sinapsis eléctrica aparentemente surgió primero en la evolución debido a que es más

abundante en organismos inferiores. En mamíferos solo se encuentra en algunas neuronas del tronco encefálico, del cerebelo y de la retina, mediando la transmisión en reflejos rápidos o que implican la sincronización de la actividad de grupos neuronales (Okamura et al., 2005).

En la sinapsis química no hay una continuidad estructural entre la neurona presináptica y la célula postsináptica, sino que existe un espacio de separación de unos 20-40 nm denominado hendidura sináptica. La transmisión sináptica comienza cuando un potencial de acción llega al terminal axónico de la neurona presináptica, modificando el potencial de membrana que activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La apertura de estos canales permite el rápido influjo de Ca^{2+} y la elevación de la concentración intracelular de este catión en el terminal presináptico, provocando la exocitosis de las vesículas sinápticas que contienen el mensajero químico, denominado neurotransmisor (NT). Los NT difunden por la hendidura sináptica hasta unirse a receptores específicos en la membrana de la célula postsináptica, los cuales serán responsables de transducir la señal hacia el interior celular para generar una respuesta (Figura 1).

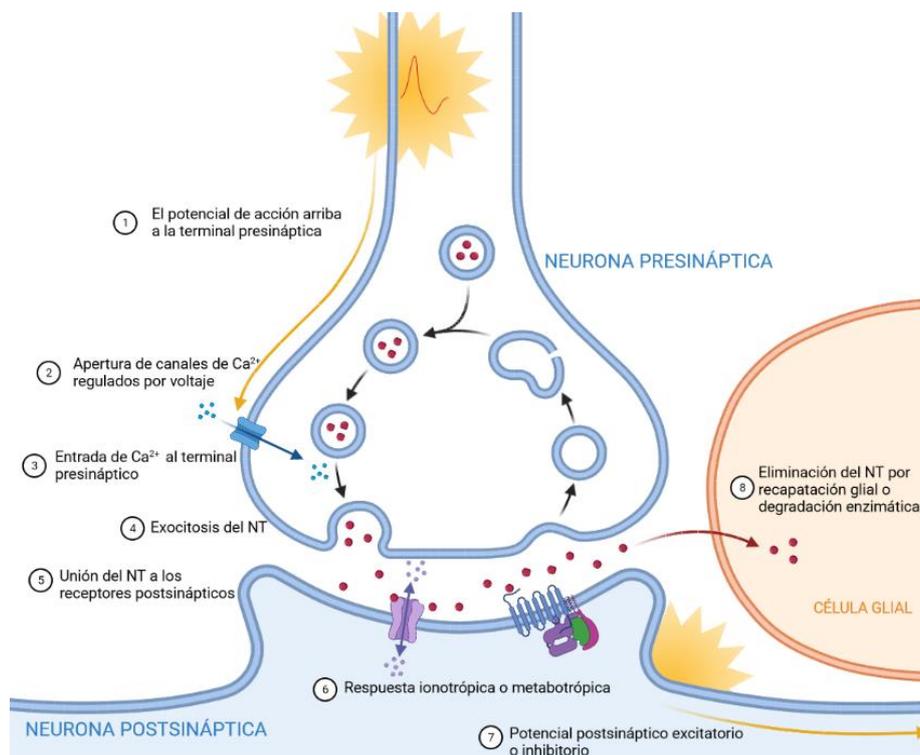


FIGURA 1. Sinapsis química.

Esquema de una sinapsis química entre dos neuronas (presináptica y postsináptica). Se muestran los pasos secuenciales de la transmisión sináptica clásica. Creado con BioRender.com.

Las principales características de la transmisión sináptica química son: (i) elevada concentración del NT en la hendidura sináptica; (ii) gran densidad de receptores postsinápticos, generalmente de baja afinidad; (iii) rápida eliminación del NT de la hendidura sináptica, por degradación enzimática o recaptación por transportadores; y (iv) rápida velocidad de comunicación, del orden de los milisegundos (ms).

La sinapsis química es el modo de transmisión sináptica preponderante en el SN, aunque también pueden encontrarse sinapsis mixtas donde hay coexistencia de la transmisión eléctrica y química.

1.2.2. Transmisión extrasináptica

A diferencia de la sinapsis química, en la transmisión extrasináptica no existe una estructura de contacto especializada entre la célula que libera el mensajero químico y la célula blanco que posee los receptores. El NT puede ser liberado tanto por células gliales como por neuronas, desde cualquiera de sus partes (cuerpo, dendritas, axón o terminal axónico). La liberación se da hacia el espacio extracelular, incluyendo al líquido cefalorraquídeo, y el movimiento del NT hacia otras células del SNC ocurre por procesos de difusión y convección originados por diferentes gradientes energéticos.

Los NT liberados desde el terminal axónico de una sinapsis clásica pueden difundir fuera de la hendidura sináptica e impactar en receptores ubicados cerca de dicha sinapsis, tanto en la terminal presináptica como en la neurona postsináptica o en un astrocito. Este tipo de transmisión extrasináptica se conoce como perisináptica.

La transmisión extrasináptica también incluye a aquella que va más allá de la región cercana a una sinapsis clásica, donde los NT pueden ser liberados desde terminales axónicos no sinápticos, varicosidades encontradas a lo largo del axón, dendritas o soma neuronal; y los receptores se encuentran a una distancia considerable en localizaciones netamente extrasinápticas.

Las principales características de la transmisión extrasináptica son: (i) baja concentración del NT, por la dilución en el fluido extracelular; (ii) baja densidad de receptores, generalmente de alta afinidad; (iii) mayor vida media del NT; y (iv) baja velocidad de comunicación, del orden de segundos a minutos.

2. Neurotransmisores

2.1. Definición y generalidades

Clásicamente un NT se define como una señal química liberada por una terminación nerviosa presináptica en la hendidura sináptica, que se une a receptores específicos presentes en la célula postsináptica modificando en forma transitoria sus propiedades eléctricas (Purves et al., 2001). Como se comentó anteriormente, hoy en día se sabe que los NT pueden ser liberados desde sitios diferentes a la terminación presináptica, así como también pueden impactar en receptores distantes de la hendidura sináptica. Además, no necesariamente modifican las propiedades eléctricas de la célula receptora sino algún aspecto relacionado con su actividad, como por ejemplo el metabolismo o la expresión génica. Es decir, de forma más general, se puede definir a un NT como un mensajero químico que media la comunicación intercelular de modo sináptico y extrasináptico (Kandel E., Koester J., et al., 2021).

A pesar de que más de 100 moléculas son reconocidas como NT, estos se clasifican en base a su tamaño en dos categorías amplias: (i) NT de molécula pequeña (NT clásicos) y (ii) neuropéptidos (NT no clásicos). Los neuropéptidos son moléculas relativamente grandes compuestas por 3 a 36 aminoácidos, que se sintetizan en el cuerpo neuronal a partir de un precursor proteico y luego son transportados al terminal presináptico. En cambio, los NT de molécula pequeña son compuestos más sencillos y de menor tamaño, que se sintetizan y empaquetan en vesículas en el terminal presináptico. En general, los NT de molécula pequeña median reacciones rápidas, mientras que los neuropéptidos modulan funciones encefálicas más lentas y continuas en el tiempo (Kandel E., Koester J., et al., 2021; Purves et al., 2001).

Entre los NT de molécula pequeña se incluyen: acetilcolina (ACh, *AcetylCholine*); algunos aminoácidos como el glutamato (Glu), la glicina (Gly, *Glycine*), el aspartato (Asp) y el ácido γ -aminobutírico (GABA, *Gamma-AminoButiric Acid*); aminas biógenas como histamina, dopamina (DA), adrenalina, noradrenalina (NA), serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT, *5-HydroxyTryptamine*); y purinas como adenosina y adenosín trifosfato (ATP, *Adenosine TriPhosphate*).

Hasta hace poco tiempo se consideraba que una neurona dada producía un único tipo de NT, pero hoy en día está demostrado que muchas neuronas pueden producir y

liberar dos o más NT diferentes. Cuando hay más de un NT en una terminación nerviosa, las moléculas se denominan cotransmisores. Estos le dan gran versatilidad a la transmisión sináptica ya que, si son empaquetados en vesículas diferentes, como generalmente ocurre, pueden ser liberados de forma no necesariamente simultánea. La estimulación de baja frecuencia generalmente solo libera NT de molécula pequeña ya que, los neuropéptidos requieren alta frecuencia de estímulos para ser liberados (Purves et al., 2001).

Una transmisión sináptica eficaz requiere un control minucioso de la concentración del NT en la hendidura sináptica, por lo que las neuronas controlan rigurosamente la síntesis, el empaquetamiento en vesículas, la liberación y también, la degradación de los NT.

En el siguiente apartado se describe con mayor detalle a la ACh debido a que es el NT endógeno del receptor en el que se centra este trabajo de tesis

2.2. ACh

En un experimento muy sencillo, el fisiólogo alemán Otto Loewi en 1926, puso a prueba la hipótesis de que la información eléctrica es transferida desde una neurona hasta la siguiente célula por medio de un mensajero químico. Loewi aisló dos corazones de rana, en el primero midió la frecuencia cardíaca luego de estimular eléctricamente el nervio vago, notando una disminución. Recogió el líquido de perfusión de dicho corazón y lo utilizó para perfundir el segundo en ausencia de estimulación eléctrica del vago. En este segundo corazón también detectó una reducción de la frecuencia cardíaca. Así demostró que el nervio vago libera un mensajero químico que es responsable de disminuir los latidos del corazón. Loewi la llamó “sustancia del vago”, y más tarde se demostró que esta “sustancia” era la ACh, identificando así al primer NT (Purves et al., 2001).

La ACh es sintetizada en las terminaciones nerviosas a partir del acetyl-CoA y de la colina en una reacción de un único paso catalizada por la acetiltransferasa de colina (Figura 2). Las acciones postsinápticas de este NT son terminadas por su degradación enzimática mediada por la acetilcolinesterasa. Este hecho diferencia a la ACh del resto de los NT de molécula pequeña, en los que las acciones postsinápticas son terminadas por recaptación del NT. Tras la hidrólisis por la acetilcolinesterasa, la ACh se desdobra en acetato y colina. Las terminaciones nerviosas son ricas en un transportador de colina de

alta afinidad que capta la colina hacia el interior de la neurona presináptica a favor del gradiente de Na^+ , para que pueda volver a ser utilizada en la síntesis de ACh (Figura 2) (Kandel E., Koester J., et al., 2021; Purves et al., 2001).

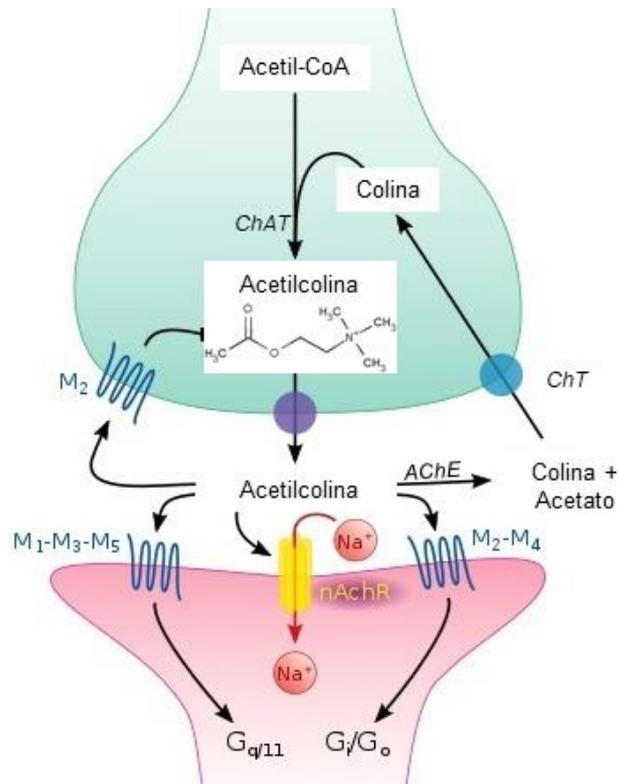


FIGURA 2. Sinapsis colinérgica.

Esquema de una sinapsis química colinérgica. Se muestra la síntesis de ACh en la neurona presináptica, su degradación enzimática en la hendidura sináptica y sus receptores ionotrópicos y metabotrópicos en la neurona postsináptica. ChAT: acetiltransferasa de colina; AChE: acetilcolinesterasa; ChT: transportador de colina; nAChR: receptor nicotínico de ACh; M1-M5: subtipos de receptores muscarínicos de ACh. Modificada a partir de Smedlib, basado en el original de Pancrat [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)].

La ACh es el NT en: (i) las neuronas motoras del SN somático; (ii) las neuronas preganglionares del SN autónomo; (iii) las neuronas postganglionares del SN parasimpático; y (iv) varias sinapsis a nivel del SNC (Kandel E., Koester J., et al., 2021; Purves et al., 2001).

En el encéfalo se describen dos sistemas colinérgicos principales: (i) el sistema magnocelular del cerebro anterior basal; y (ii) el sistema del tronco encefálico. El sistema colinérgico magnocelular del cerebro anterior basal está compuesto por el núcleo basal magnocelular o de Meynert, los núcleos del septo medial, y los núcleos de las ramas horizontal y vertical de la banda diagonal de Broca, que dirigen sus proyecciones

principalmente a diversas áreas de la neocorteza, así como a regiones límbicas (corteza cingulada, corteza entorrinal e hipocampo), y a otras estructuras, incluida la amígdala basolateral y el bulbo olfatorio. Por otro lado, el sistema colinérgico del tronco encefálico incluye neuronas ubicadas en el núcleo tegmental pedunculopontino y en el núcleo tegmento-pontino laterodorsal, que inervan principalmente el tálamo y los ganglios basales, y también en menor medida el cerebro anterior basal y algunas estructuras corticales (Newman et al., 2012).

En la placa neuromuscular y en los ganglios autónomos la ACh es el NT de una transmisión sináptica clásica. En cambio, en el SNC la transmisión extrasináptica resulta ser el principal mecanismo de transmisión colinérgica, ya que solo aproximadamente un 10 % de los terminales axónicos de neuronas colinérgicas establecen contactos sinápticos con neuronas postsinápticas (Lendvai y Vizi, 2008). Este hecho, le otorga a la ACh un rol fundamentalmente neuromodulador en el SNC. La mayoría de las neuronas productoras de ACh en el SNC libera el NT al medio extracelular en puntos no sinápticos, incluso desde varicosidades axonales. Esta ACh no es degradada tan rápidamente ni por completo como ocurre en la hendidura sináptica (Lendvai et al., 2013), por lo que persiste en el medio extracelular por más tiempo, posibilitando la activación de receptores de alta afinidad. Además, la colina que se forma por la escisión del NT también puede actuar como agonista de algunos receptores de ACh (Dani y Bertrand, 2007), los cuales generalmente se encuentran en sitios extrasinápticos, incluyendo localizaciones perisinápticas (Lendvai y Vizi, 2008).

3. Receptores de neurotransmisores

La respuesta que genera un NT depende del receptor al que se une. Los receptores de NT son proteínas integrales de membrana que poseen un sitio al que se une de forma específica el NT. Luego de dicha unión el receptor sufre un cambio conformacional que de forma directa o indirecta conlleva a la apertura o cierre de canales iónicos. Los receptores de NT se pueden clasificar en dos grandes categorías: (i) receptores metabotrópicos, y (ii) receptores ionotrópicos (Figura 3).

Los receptores metabotrópicos tras ser activados por el NT disparan una cascada de señalización intracelular que puede generar la apertura o el cierre de canales iónicos. La mayoría son receptores de siete segmentos transmembrana que se acoplan a proteína G (GPCR, *G-Protein Coupled Receptor*) (Figura 3). A este grupo pertenecen los receptores

muscarínicos de ACh, los receptores de GABA tipo B ($GABA_B R$, *GABA B Receptor*), la mayoría de los receptores de 5-HT, y los receptores metabotrópicos de Glu (Purves et al., 2001).

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos activados por ligando (LGIC, *Ligand-Gated Ion Channel*), es decir por NT (Figura 3). El cambio conformacional que induce la unión del NT al receptor ionotrópico provoca la apertura de un poro iónico en su interior, permitiendo el pasaje de iones entre ambos lados de la membrana (Kalamida et al., 2007).

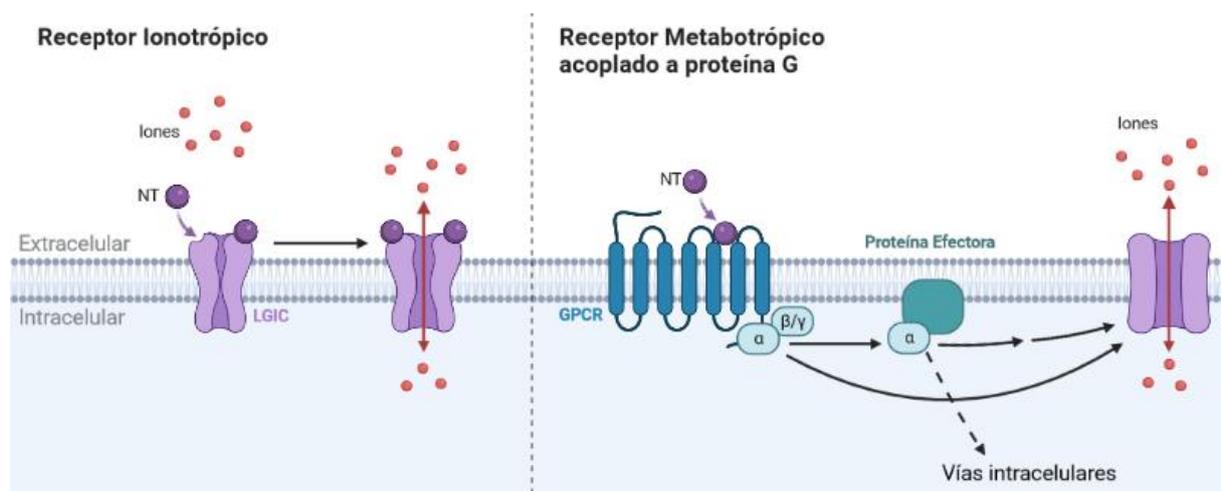


FIGURA 3. Receptores ionotrópicos y metabotrópicos.

Comparación esquemática de un receptor ionotrópico y uno metabotrópico acoplado a proteína G. Creado con BioRender.com.

Los receptores ionotrópicos y metabotrópicos ejercen sus acciones fisiológicas con diferente escala temporal. Los primeros lo hacen de forma rápida, generando potenciales postsinápticos en 1-2 ms que no duran más de 10 ms; y los segundos lo hacen de manera más lenta, con potenciales postsinápticos que tardan en producirse segundos a minutos (Purves et al., 2001). Ambos tipos de receptores pueden sufrir desensibilización, que se define como una disminución en la amplitud de las respuestas postsinápticas debido a la presencia continua del NT. En general, este fenómeno ocurre durante la aplicación repetida de NT, por ejemplo, durante un tren de potenciales de acción.

Es importante destacar que un NT puede activar tanto a receptores metabotrópicos como ionotrópicos, incluso en una misma sinapsis. Por lo tanto, la respuesta postsináptica de un NT está determinada por el complemento de receptores ionotrópicos y metabotrópicos en la célula postsináptica.

La ACh posee receptores ionotrópicos y metabotrópicos (Figura 2). Los primeros, se denominan receptores nicotínicos de ACh (nAChR, *Nicotinic AcetylCholine Receptor*), y serán descritos en detalle más adelante. Los segundos son receptores acoplados a proteína G, y se conocen como receptores muscarínicos de ACh (mAChR, *Muscarinic Acetylcholine Receptor*). Existen cinco subtipos de mAChR en el SNC que se clasifican en dos grupos: (i) los subtipos M1, M3 y M5 se acoplan a proteína G_q , y pueden localizarse postsinápticamente (mediando un efecto excitatorio) o presinápticamente (favoreciendo la liberación de NT); y (ii) los subtipos M2 y M4 se acoplan a proteína $G_{i/o}$, y pueden localizarse postsinápticamente (mediando un efecto inhibitorio) o presinápticamente (disminuyendo la liberación de NT).

3.1. Canales iónicos pentaméricos activados por ligando

Los LGIC se clasificaron históricamente en tres categorías según el número de subunidades que forman el receptor y la cantidad de segmentos transmembrana que tiene cada subunidad (Collingridge et al., 2009; Le Novère y Changeux, 2001): (i) canales activados por ATP (P2X) que poseen tres subunidades homólogas, cada una con dos segmentos transmembrana; (ii) canales activados por Glu (receptores NMDA, AMPA, kainato) formados por cuatro subunidades homólogas, cada una con tres segmentos transmembrana; y (iii) canales iónicos pentaméricos activados por ligando (pLGIC, *Pentameric Ligand-Gated Ion Channel*) formados por cinco subunidades homólogas, cada una con cuatro segmentos transmembrana. En los últimos años se han añadido dos categorías más dentro de los LGIC: (iv) los canales de potencial receptor transitorio (TRP, *Transient Receptor Potential*); y (v) los canales iónicos sensibles al ácido (ASIC, *Acid-Sensing Ion Channel*) (Briggs y Gopalakrishnan, 2007).

Los pLGIC son una superfamilia de receptores ionotrópicos constituidos por el ensamblaje de cinco subunidades que se distribuyen delineando un poro central por donde pasan los iones. Los pLGIC se encuentran tanto en organismos eucariotas como en procariotas, e incluye a la familia de receptores *Cys-loop*, que están conformados por cinco subunidades homólogas, cada una de las cuales tiene un extremo N-terminal extracelular, cuatro segmentos transmembrana (M1-M4), un gran *loop* intracelular entre M3 y M4, y un extremo C-terminal extracelular corto (Figura 4). Estas subunidades presentan en su dominio extracelular N-terminal un puente disulfuro (S-S) entre dos residuos cisteínas

separadas por 13 aminoácidos que conforman un *loop*, que da el nombre de “*Cys-loop*” a esta familia (Miller y Smart, 2010; Thompson et al., 2010).

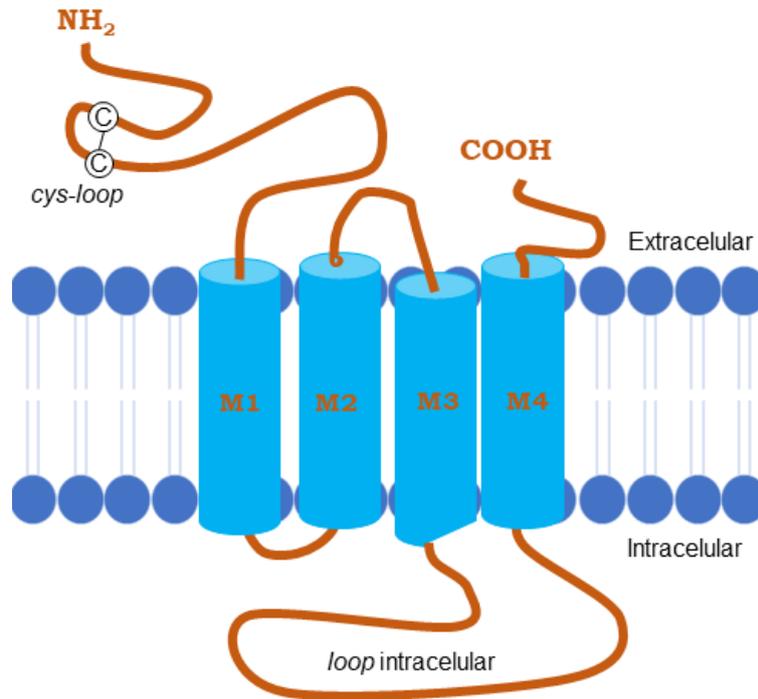


FIGURA 4. Subunidad de un receptor *Cys-loop*.

Esquema de una subunidad de receptor *Cys-loop*. Se muestran: (i) el extremo N-terminal, el *Cys-loop* y el extremo C-terminal en la cara extracelular; (ii) los cuatro segmentos transmembrana (M1-M4); y (iii) el gran *loop* que une M3 y M4 en la cara intracelular.

Además de los receptores *Cys-loop*, los pLGIC comprenden los antecesores procariotas, que carecen del *cys-loop* característico, pero poseen estructuras pentaméricas y conservan muchos residuos funcionalmente importantes con sus homólogos eucariotas. Estos son los canales iónicos activados por ligando de *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) y de *Gloeobacter violaceus* (GLIC) (R. J. Hilf y Dutzler, 2009; J. Zhang et al., 2013a).

En vertebrados, los receptores *Cys-loop* se subdividen en dos grupos: (i) los que son selectivos a cationes, como los nAChR, los receptores de 5-HT tipo 3 (5-HT₃R, 5-HydroxyTryptamine 3 Receptor) y los receptores activados por zinc (ZAC, Zinc-Activated Ion Channel); y (ii) los que son selectivos a aniones, entre los cuales están los receptores de GABA tipo A (GABA_AR, GABA A Receptor) y los receptores activados por Gly (GlyR, Glycine Receptor) (Le Novère y Changeux, 2001; Lynagh y Pless, 2014; Thompson et al., 2010).

Este trabajo de tesis se basa en el estudio de la modulación de las funciones ionotrópicas y metabotrópicas del receptor nicotínico de ACh $\alpha 7$ humano (nAChR $\alpha 7$), por lo que a continuación la introducción se enfoca en la descripción de la estructura y función de los nAChR, con énfasis en el subtipo $\alpha 7$.

4. Receptores nicotínicos

4.1. Generalidades

Los nAChR son pLGIC que pertenecen a la familia de receptores *Cys-loop* (Taly et al., 2009; Thompson et al., 2010) y están presentes en todo el reino animal, desde nematodos hasta humanos (Le Novère y Changeux, 1995). En los vertebrados, los nAChR comprenden una familia de canales catiónicos no selectivos, que son permeables a Na^+ , K^+ , Cs^+ y a los cationes bivalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Son activados endógenamente por ACh y exógenamente por nicotina (alcaloide extraído de la planta de tabaco), y se expresan tanto en células neuronales como en no neuronales.

Los nAChR están implicados en diversas condiciones patológicas, incluidos trastornos neuromusculares, neurológicos, neurodegenerativos e inflamatorios. La amplia diversidad estructural y funcional de los nAChR, así como sus principales funciones moduladoras en el SN, han despertado el interés como dianas terapéuticas para un amplio espectro de afecciones médicas.

4.2. Diversidad de subunidades

En los vertebrados, hay 17 subunidades distintas de nAChR que se combinan para producir una gran variedad de receptores pentaméricos (Figura 5) con diferentes propiedades farmacológicas y biofísicas, roles fisiológicos y localización (Le Novère y Changeux, 2001; Zoli et al., 2015). Las subunidades son de dos tipos: α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$) y no α ($\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ , y ϵ). La presencia de un puente disulfuro entre dos cisteínas adyacentes en el sitio de unión ortostérico del agonista caracteriza a una subunidad como α , mientras que la ausencia de dichas cisteínas consecutivas la convierte en una subunidad no α (R. Hurst et al., 2013; Papke, 2014; Taly et al., 2009). En mamíferos se expresan 16 de las 17 subunidades, ya que la $\alpha 8$ solo ha sido detectada en aves.

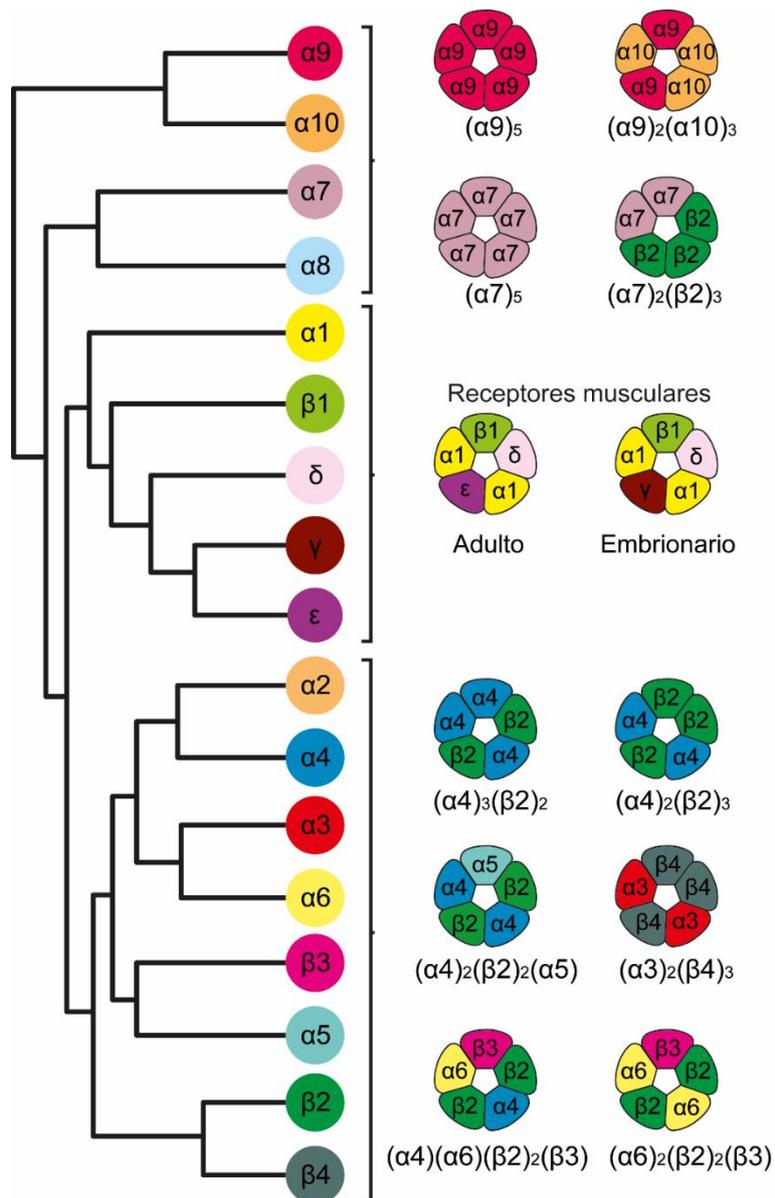


FIGURA 5. Subunidades de nAChR.

Se muestra un cladograma de subunidades de nAChR de vertebrados y ejemplos de los subtipos de nAChR más comunes que se forman por combinaciones de estas subunidades. Modificado de (Le Novère et al., 2002).

Considerando las subunidades que conforman el pentámero, los nAChR pueden ser homoméricos, si están formados por cinco subunidades α iguales, o heteroméricos, si están constituidos por dos o más subunidades distintas, de las cuales una es tipo α (necesaria para formar el sitio de unión del agonista). Las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ , y ϵ se consideran de tipo muscular ya que se combinan para formar el nAChR heteromérico muscular, tanto embrionario como adulto (Figura 5). El resto de las subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$) son de tipo neuronal dado que se asocian para formar distintos tipos de nAChR

que se expresan principalmente en neuronas, pero también en células no neuronales como las gliales, epiteliales e inmunes (Sharma y Vijayaraghavan, 2002). Las reglas que rigen el ensamblaje combinatorio de subunidades para formar nAChR funcionales son en su mayor parte desconocidas. Mientras que algunas subunidades pueden combinarse con varias subunidades, aunque específicas, otras solo pueden formar receptores funcionales con un subconjunto limitado. Solo las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ son capaces de formar receptores homoméricos. Las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 9$ también puede formar receptores heteroméricos, $\alpha 7\beta 2$ y $\alpha 9\alpha 10$ respectivamente (Figura 5). Por su parte las subunidades restantes solo pueden formar receptores heteroméricos por combinación de subunidades α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$) y β ($\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$) (Figura 5).

4.3. Distribución celular y funciones fisiológicas

En términos generales, los nAChR se dividen en dos clases principales: (i) muscular, y (ii) neuronal. Los receptores de tipo muscular están ubicados en la unión neuromuscular (NMJ, *Neuromuscular Junction*) y su activación produce potenciales despolarizantes de la placa terminal que conducen a la contracción muscular. Los receptores de tipo neuronal se encuentran en neuronas en sistema SNC y en SNP, así como también en varios tipos de células no neuronales, como células inmunes, epiteliales y gliales (Zoli et al., 2015).

4.3.1. nAChR en la NMJ

La NMJ es una sinapsis química que se forma entre una motoneurona y una fibra muscular esquelética. Tras la llegada del potencial de acción, la terminal de la motoneurona libera ACh, que activa los nAChR de la fibra muscular, despolarizándola para desencadenar la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático e iniciar la contracción muscular. Las alteraciones en la formación y el mantenimiento de la NMJ causan trastornos neurológicos, entre los que se incluyen el síndrome miasténico congénito y la miastenia gravis (L. Li et al., 2018). Los nAChR musculares de mamífero existen en dos isoformas diferentes según la etapa del desarrollo. El receptor embrionario está compuesto de dos subunidades $\alpha 1$, una $\beta 1$, una γ y una δ : $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ (Figura 5). Durante la maduración de la placa terminal, la subunidad γ es reemplazada por la ϵ para formar el receptor muscular adulto: $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ (Figura 5), que difiere del embrionario en conductancia y propiedades cinéticas (Bouzat et al., 1994; Mishina et al., 1986).

4.3.2. nAChR en el SNP

En el SNP los nAChR median la transmisión sináptica rápida en los ganglios del SN autónomo entre la neurona preganglionar y la neurona postganglionar o la célula cromafín en la médula suprarrenal. En estas sinapsis, los nAChR se encuentran agregados en gran densidad sobre las membranas de las células postsinápticas, y están compuestos predominantemente por las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, y $\beta 4$ (Ferns, 2021; N. Wang et al., 2002). La subunidad $\alpha 3$ es por lejos la más abundante entre las subunidades α , y se la encuentra principalmente formando el receptor $\alpha 3\beta 4^*$ (el * indica que otra subunidad puede formar parte del pentámero). Estos receptores pueden presentar dos estequiometrías diferentes: $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 3$ y $(\alpha 3\beta 4)_2\beta 4$ (Figura 5), o también combinarse con una tercera subunidad para formar los receptores $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 5$ y $(\alpha 3\beta 4)_2\beta 2$. Además, en el SNP se encuentran nAChR en los ganglios de la raíz dorsal de los nervios espinales. Estos últimos son un blanco terapéutico de interés ya que modulan señales nociceptivas (Hone y Mcintosh, 2017).

4.3.3. nAChR en el SNC

A pesar de ser receptores ionotrópicos, que se asocian típicamente a la transmisión sináptica rápida, los nAChR a nivel de SNC median principalmente un efecto neuromodulador: (i) en localización postsináptica generan potenciales postsinápticos excitatorios que favorecen la potenciación a largo plazo; (ii) en localización presináptica favorecen la liberación de NT como GABA, Glu, ACh, DA, y NA; y (iii) en localización extrasináptica modulan la actividad eléctrica de las neuronas y activan una variedad de vías de señalización intracelular (Corradi y Bouzat, 2016b) (Figura 6).

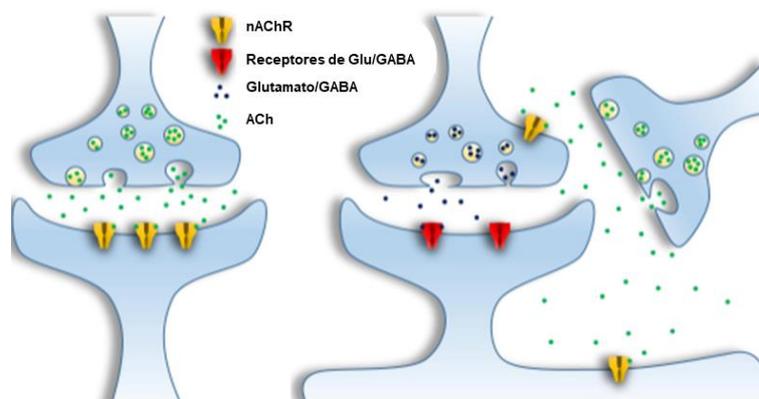


FIGURA 6. Transmisión sináptica y extrasináptica de los nAChR en el SNC.

Esquema que ilustra las diferentes localizaciones de los nAChR en el SNC: postsináptica (izquierda), presináptica (medio) y extrasináptica (derecha). Modificado de (Corradi y Bouzat, 2016b).

Los nAChR neuronales modulan la excitabilidad neuronal, median la plasticidad sináptica, contribuyen en procesos cognitivos y de memoria, regulan diversos comportamientos y están involucrados en la neuroprotección y en los efectos gratificantes de la nicotina (Picciotto et al., 2012). Debido a su importante rol en patologías del SNC, los nAChR son blancos farmacológicos de interés en desórdenes neurológicos, neurodegenerativos e inflamatorios.

En el SNC de mamíferos existen varios subtipos diferentes de nAChR distribuidos en distintas áreas. Cada subtipo tiene propiedades biofísicas y farmacológicas diferentes que surgen de la composición y estequiometría de las subunidades que lo conforman. Los nAChR más abundantes y mejor caracterizados en SNC son los subtipos $\alpha 4\beta 2^*$ y $\alpha 7$.

El receptor $\alpha 4\beta 2^*$ es el mayoritario y está muy extendido en todo el SNC, con sus niveles más altos en tálamo, sustancia negra parte compacta y área tegmental ventral (Drago et al., 2003). Participa en procesos cognitivos, de consciencia y de dolor, y además se vincula con el tabaquismo ya que es un mediador clave en los efectos aditivos de la nicotina. Está asociado a epilepsia del lóbulo frontal nocturna autosómica dominante, depresión y desórdenes neurodegenerativos, como enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Gotti y Clementi, 2004; Tapper et al., 2004; Zanardi et al., 2002). Estos receptores presentan dos estequiometrías principales: $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ y $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ (Figura 5), que difieren en la sensibilidad a la ACh, la cinética de activación y desensibilización, la permeabilidad al Ca^{2+} , la conductancia unitaria, la modulación por Zn^{2+} y la sensibilidad a la exposición crónica de nicotina (Moroni et al., 2006). La estequiometría $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ tiene mayor sensibilidad a la ACh, menor conductancia unitaria y menor permeabilidad al Ca^{2+} que la estequiometría $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$, además su expresión se regula positivamente de manera selectiva por la nicotina (Benallegue et al., 2013; Moroni et al., 2006). Las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ también pueden ensamblarse con otras subunidades neuronales como $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\beta 3$. Los receptores $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$ y $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 3$ se han encontrado en una pequeña proporción en SNC y se han asociado a la adicción a nicotina. La subunidad $\alpha 6$ forma receptores que se expresan en vías dopaminérgicas como la mesolímbica y la nigroestriatal, con un rol en la enfermedad de Parkinson (Zoli et al., 2015).

El segundo nAChR más abundante en SNC es el homomérico ($\alpha 7$)₅, que se encuentra altamente expresado en hipocampo, corteza y regiones límbicas subcorticales (Bouzat et al., 2018; Lendvai et al., 2013). Allí cumple un rol importante en procesos de cognición, atención y memoria, al regular la liberación de NT, mediar la transmisión sináptica rápida y modular la excitabilidad neuronal (Albuquerque et al., 2009; Zoli et al., 2018). Una disminución de su actividad se ha asociado con diversos desórdenes neurológicos y neurodegenerativos, incluyendo esquizofrenia, autismo y enfermedad de Alzheimer (Buckingham et al., 2009; Corradi y Bouzat, 2016b). El nAChR $\alpha 7$ posee una elevada permeabilidad al Ca²⁺ y una velocidad de desensibilización muy rápida, la mayor de la familia (Bouzat et al., 2018). Además de su función ionotrópica canónica, $\alpha 7$ funciona también como un receptor metabotrópico, ya que luego de su activación puede disparar distintas vías de señalización intracelular dependiendo del tipo celular estudiado (Corradi y Bouzat, 2016b; Egea et al., 2015; Kabbani y Nichols, 2018).

En los últimos años se ha demostrado que, a pesar de su carácter homomérico, la subunidad $\alpha 7$ puede ensamblarse con otras subunidades para formar receptores heteroméricos. En particular, se han detectado receptores heteroméricos $\alpha 7\beta 2$ en varias áreas del cerebro, y aunque su rol fisiológico aún no se conoce en profundidad, se sugiere que estarían involucrados en anestesia y enfermedad de Alzheimer (Nielsen et al., 2018; Thomsen et al., 2015; J. Wu et al., 2016; Zoli et al., 2015).

4.3.4. nAChR neuronales en células no neuronales

Los nAChR neuronales también se expresan en células no neuronales, como las células gliales, inmunitarias y epiteliales (Wessler y Kirkpatrick, 2008). Estos receptores responden a la ACh liberada por las terminaciones nerviosas vagales o por células que la producen localmente. Tienen un rol importante en la proliferación celular, la adhesión, la migración, la secreción, la supervivencia y la apoptosis. Los nAChR presentes en células del sistema inmune regulan procesos inflamatorios, siendo $\alpha 7$ un actor clave de la vía antiinflamatoria colinérgica, que es un vínculo entre las fibras eferentes vagales y el sistema inmune innato.

4.4. Estructura

Todas las subunidades que forman los nAChR poseen entre 400-500 aminoácidos y comparten una estructura terciaria similar que comprende: (i) un gran segmento

extracelular N-terminal de ~200 aminoácidos compuesto por diez láminas β ; (ii) cuatro segmentos o hélices α transmembrana (M1, M2, M3 y M4) unidos por *loops*, de los cuales M1-M2 y M2-M3 son cortos; (iii) un gran *loop* intracelular de tamaño variable que conecta los segmentos M3-M4; y (iv) un corto segmento extracelular C-terminal (Figura 4) (Unwin, 2005).

Se han resuelto estructuras 3D de alta resolución para algunos nAChR, incluido el muscular, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Gharpure et al., 2019; Morales-Perez et al., 2016; Noviello et al., 2021; Rahman et al., 2020; Unwin, 2005; Zhao et al., 2021). Las cinco subunidades están dispuestas pseudosimétricamente alrededor de un eje central formando un receptor con tres dominios estructurales: (i) el dominio extracelular N-terminal (ECD, *ExtraCellular Domain*), que posee los sitios de unión del agonista; (ii) el dominio transmembrana (TMD, *TransMembrane Domain*), que contiene el poro iónico; y (iii) el dominio intracelular (ICD, *IntraCellular Domain*), que posee determinantes de la conductancia y sitios de regulación y señalización intracelular (Figura 7). Entre el ECD y el TMD existe una zona de transición estructural, denominada región de acoplamiento, que es esencial para el vínculo funcional entre la unión del agonista y la apertura del canal (Bouzat et al., 2004).

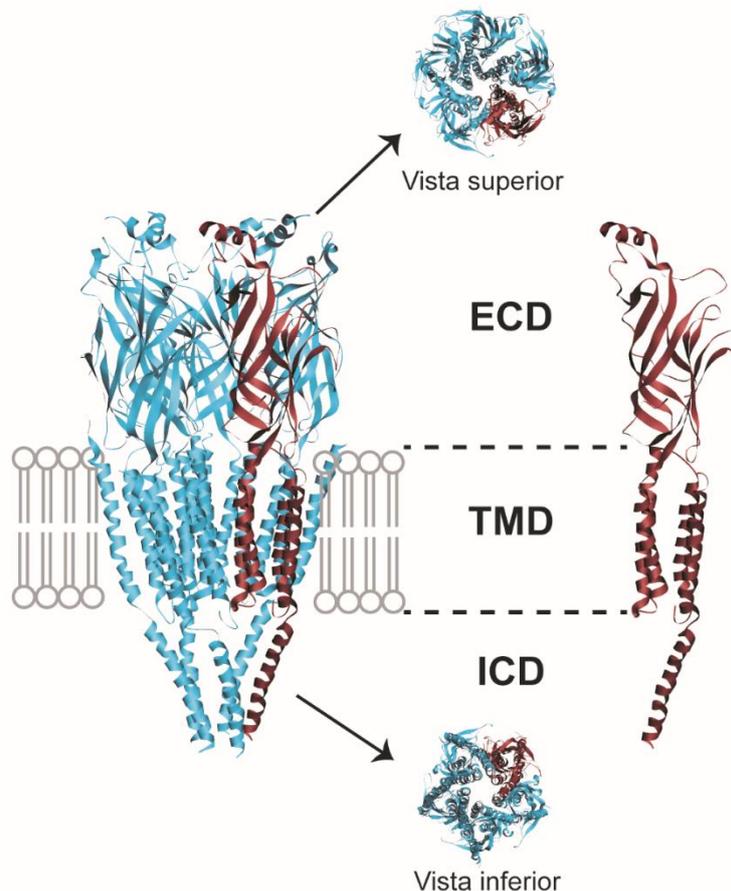


FIGURA 7. Estructura de los nAChR.

Modelo tridimensional del nAChR muscular de *Torpedo marmorata*, PDB: 2BG9 (Unwin, 2005). A la izquierda se muestra una vista lateral del receptor y a la derecha una vista lateral de una subunidad individual. Se señalan los tres dominios estructurales: ECD, TMD e ICD. Se muestran también las vistas superior e inferior del arreglo pentamérico.

4.4.1. Dominio extracelular

Cada una de las cinco subunidades contribuye al ECD del receptor con una hélice α corta en el extremo N-terminal que es seguida por 10 láminas u hojas plegadas β ($\beta 1$ – $\beta 10$) formando una estructura β -sandwich. Las hojas plegadas β se conectan entre sí mediante *loops* (1-10), siendo el *loop* 1 el que une la hélice α N-terminal con la lámina $\beta 1$, el *loop* 2 el que une las láminas $\beta 1$ y $\beta 2$, y así sucesivamente. La lámina $\beta 10$ se continúa con el inicio de M1. El *cys-loop* altamente conservado que da el nombre a la familia de receptores es el *loop* 7 que une las láminas $\beta 6$ y $\beta 7$, y se ubica en la parte inferior del ECD, en estrecho contacto con el TMD (Figura 8A y B). Las láminas β son antiparalelas y opuestas, y en base a la proximidad del eje central del pentámero se clasifican en internas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 8$) y externas ($\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 9$ y $\beta 10$) (Thompson et al., 2010).

Ubicado a aproximadamente a 40 Å de la membrana plasmática, el ECD posee el sitio de unión ortostérico, que es el sitio donde se une el ligando que activa al receptor en forma endógena (ACh). Cada sitio de unión ortostérico es una cavidad que queda delimitada en la interfaz entre los ECD de dos subunidades adyacentes; con una cara, denominada cara principal (+), proporcionada por una subunidad de tipo α , y la otra, la cara complementaria (-), proporcionada por una subunidad α o no α (Figura 8B y C). Cada cara está formada por tres *loops* o segmentos de aminoácidos. La cara principal, conformada por los *loops* A, B y C, siempre es aportada por una subunidad de tipo α , debido a que posee las cisteínas adyacentes unidas por un puente disulfuro en el *loop* C que son fundamentales para la unión del agonista. La cara complementaria, conformada por los *loops* D, E y F, puede ser aportada por cualquier subunidad, α o no α (Figura 8B y C) (Corringer et al., 2000; Sine, 2002; Taly et al., 2009; Thompson et al., 2010).

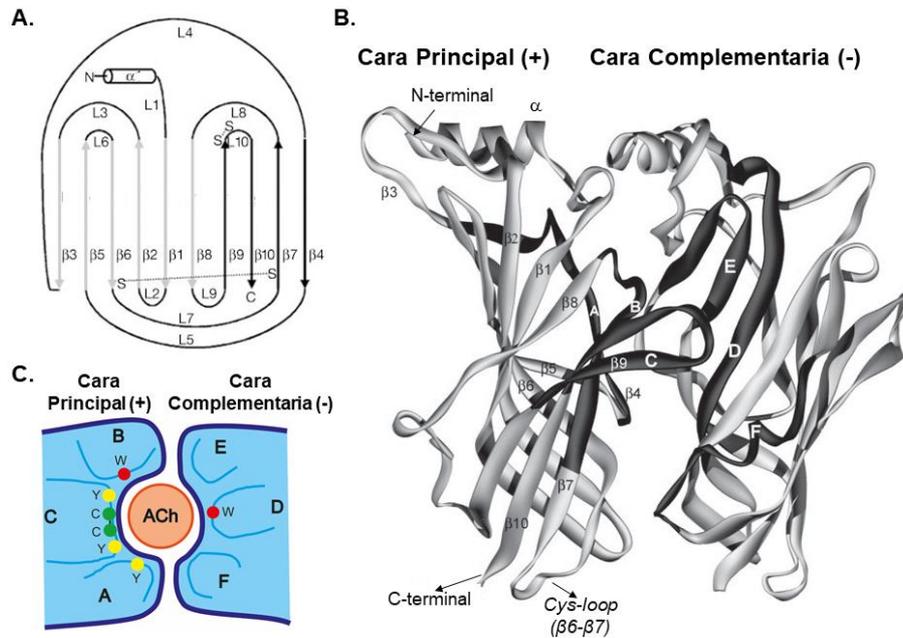


FIGURA 8. ECD de los nAChR.

(A) Diagrama de topología de una subunidad de la proteína unidora de ACh (AChBP, *Acetylcholine Binding Protein*) de *Lymnaea stagnalis*, modificado de (Brejc et al., 2001). Las subunidades de AChBP tienen una longitud de 210 residuos y forman un homopentámero estable que es un análogo del ECD de los nAChR. Se muestra el extremo N-terminal, la hélice α , las hojas plegadas β ($\beta 1$ – $\beta 10$), los *loops* (L1-L10), el extremo C-terminal y los puentes disulfuro (S-S).

(B) Se muestra la interfaz entre dos subunidades de AChBP de *Lymnaea stagnalis*, modificado de (Thompson et al., 2010). La subunidad de la izquierda aporta la cara principal (*loops* A, B y C) y la de la derecha la complementaria (*loops* D, E y F). En la subunidad que aporta la cara principal se muestra el N-terminal, la hélice α , las hojas plegadas β ($\beta 1$ – $\beta 10$), el extremo C-terminal y el *cys-loop*.

(C) Representación esquemática del sitio de unión de ACh en la interfaz entre dos subunidades adyacentes en el ECD. Se señalan los residuos aromáticos claves y el puente disulfuro conservado en el *loop* C de la subunidad α . Y: tirosina; W: triptófano; y C: cisteína.

El número de sitios de unión ortostéricos varía entre los distintos nAChR, por ejemplo, el muscular adulto posee dos en las interfaces α/ϵ y α/δ ; el $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ también tiene dos en las interfaces $\alpha 4/\beta 2$; el $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ posee un tercer sitio en la interfaz $\alpha 4/\alpha 4$, que reduce la sensibilidad a la ACh; y el $(\alpha 7)_5$ tiene cinco sitios idénticos en las interfaces $\alpha 7/\alpha 7$ (Bouzat, 2012; Brejc et al., 2001). La mayoría de los nAChR se activan con dificultad cuando solo se ocupa un sitio de unión ortostérico. Para la máxima activación se requiere la ocupación de dos o tres sitios. El nAChR $\alpha 7$ es la excepción, ya que la ocupación de uno de los cinco sitios es suficiente para la activación máxima (N. Andersen et al., 2013a), lo cual resulta fundamental para la transmisión extrasináptica.

Los *loops* A, B y C de la cara principal forman un nido de residuos aromáticos (triptófano y tirosina) con capacidad de hacer interacciones catión- π con el grupo amonio cargado positivamente de la ACh u otros ligandos (Figura 8C). La cara complementaria se correlaciona con selectividad a las drogas debido a interacciones divergentes con diferentes ligandos. Además de las interacciones catión- π , las fuerzas de estabilización de los ligandos en el sitio de unión incluyen interacciones dipolo-catión, puentes de hidrógeno y fuerzas de *Van der Waals* (C. J. B. daCosta y Baenziger, 2013; Noviello et al., 2021; Sine, 2002; Thompson et al., 2010; Zhao et al., 2021).

4.4.2. Dominio transmembrana

El TMD está compuesto por cuatro segmentos o hélices α de cada subunidad (M1, M2, M3 y M4) que atraviesan la membrana plasmática de forma perpendicular. Este dominio contiene el poro del canal iónico ubicado en el eje de simetría en el centro de las hélices formado por los segmentos M2 de las cinco subunidades (anillo interno) (Figura 9A). Las 15 hélices α restantes (M1, M3 y M4 de las cinco subunidades) forman un anillo externo que actúa como un escudo que protege al canal de los lípidos de la membrana (Bouzat, 2012) (Figura 9A). Los segmentos M4 del anillo externo son los más distales al poro central y los que más contacto tienen con el dominio lipídico de la membrana. Actúan como sensores del ambiente lipídico que rodea al receptor, alterando sus propiedades funcionales. Se ha demostrado que mutaciones en los aminoácidos de los segmentos M4 expuestos a los lípidos modifican la función del canal (C. J. B. daCosta y Baenziger, 2009). Los segmentos M1 y M3 quedan en una localización intermedia entre M2 y M4 (Miyazawa et al., 2003; Thompson et al., 2010).

El poro iónico bordeado por las hélices α M2 muestra una organización estratificada en la que anillos de cinco residuos (uno de cada subunidad), generalmente homólogos, se alinean a lo largo del eje Z formando la pared interna del canal. Siguiendo este eje, desde la porción extracelular hacia la intracelular se distinguen: un anillo externo, tres anillos hidrofóbicos, dos anillos polares, un anillo intermedio y un anillo interno (Figura 9B). Los aminoácidos de M2 se enumeran desde su nacimiento en la porción intracelular y hacia la extracelular como 0' a 20' (Corringer et al., 2000; Nemezc et al., 2016; Thompson et al., 2010). El anillo externo en 20', que da inicio al canal, está formado generalmente por residuos polares con carga negativa que atraen electrostáticamente a los cationes, lo que favorece su traslocación a través del poro, por ejemplo, en el nAChR $\alpha 7$ el residuo 20' es

un ácido glutámico (Figura 9B). A continuación, descendiendo en el eje Z desde el lado extracelular, se encuentra una serie de tres anillos hidrofóbicos (16', 13' y 9') que contienen principalmente residuos muy conservados de leucina (Figura 9B). Estos anillos hidrofóbicos conforman una región denominada compuerta o *gate* de activación del poro iónico donde la constricción es máxima en el anillo conservado de leucinas (L9') debido a las interacciones hidrofóbicas que se dan entre los residuos. El consenso para el diámetro del poro en esta zona en el estado cerrado de los receptores *Cys-loop* es de aproximadamente 6 a 8 Å, por lo que la barrera para el paso de iones no está dada por oclusión estérica, sino por una cuestión energética debido a la alta hidrofobicidad (Absalom et al., 2009; Morales-Perez et al., 2016). Después de la compuerta, se presentan dos anillos polares en posición 6' y 2', un anillo intermedio en -1' y, finalmente, un anillo interno en -4', que es parte del *loop* intracelular entre M1 y M2 (Figura 9B). Los anillos intermedio e interno poseen aminoácidos cargados negativamente (Asp y Glu) que, al formar complejos transitorios con cationes hidratados, sustituyen las moléculas de agua disminuyendo la energía necesaria para su pasaje a través del poro (Taly et al., 2009). Esta porción final del poro presenta residuos de cargas positivas en los canales selectivos a aniones, por lo que se la considera el filtro de selectividad del receptor (Unwin, 2005), con una influencia muy significativa sobre la conductancia y la selectividad iónica (Taly et al., 2009). En la porción citoplasmática del poro, junto al filtro de selectividad, se ha postulado la presencia de una compuerta de desensibilización, que estaría formada por el *loop* M1-M2 y la interfaz intracelular entre M2 y M3 (Gielen et al., 2015; Gielen y Corringer, 2018).

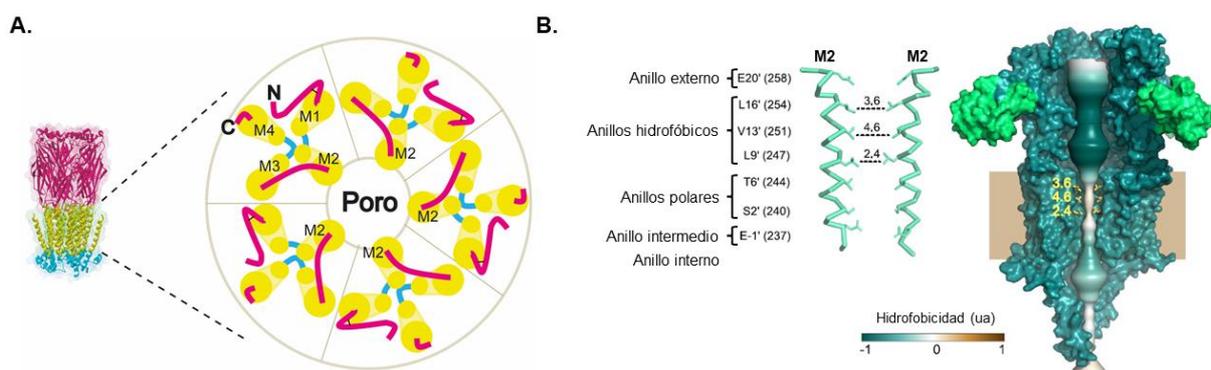


FIGURA 9. TMD de los nAChR.

(A) A la izquierda se muestra la vista lateral del receptor $\alpha 4\beta 2$ con los dominios funcionales en diferentes colores (ECD en rosa, TMD en amarillo e ICD en celeste), modificado de (Morales-Perez et al., 2016). A la derecha se muestra un esquema de la vista superior del TMD del receptor donde se visualiza el poro delimitado por los segmentos M2 de las cinco subunidades.

(B) A la izquierda se muestran en vista lateral dos hélices α M2 del nAChR α 7 en estado cerrado por unión al antagonista α -bungarotoxina (α -BTX) (Noviello et al., 2021). El poro está delimitado por anillos de 5 aminoácidos cada uno (aquí se muestran solo 2, uno de cada M2) que se disponen de forma estratificada siguiendo el eje Z desde el lado extracelular al intracelular. Se indican los anillos y los aminoácidos (tipo y numeración) que los forman según (Noviello et al., 2021). Los puntos de constricción se indican con línea punteada, y las distancias están expresadas en Å. A la derecha se muestra un modelo tridimensional de α 7 (verde oscuro) en estado cerrado por unión a α -BTX (verde claro) y la vía de permeación de los iones, representada por una superficie sólida coloreada por hidrofobicidad. Los puntos de constricción se indican con distancias en Å. Modificado de (Noviello et al., 2021).

4.4.3. Región de acoplamiento

La región ubicada en la interfaz entre el ECD y el TMD se denomina región de acoplamiento porque media la transición entre los cambios estructurales que ocurren en el ECD por la unión del ligando a su sitio de unión ortostérico, con los cambios que suceden en el poro iónico para permitir su apertura y el pasaje de los cationes. Esta región está formada por una serie de estructuras que permiten la transición funcional entre ambos dominios. El ECD contribuye con los *loops* 2 (β 1- β 2), 7 (β 6- β 7, *cys-loop*) y 9 (β 8- β 9), y con la parte final de la lámina β 10; mientras que el TMD aporta el segmento que se continua con la lámina β 10 (pre-M1), el *loop* M2-M3 y el extremo C-terminal luego de M4 (Bouzat, 2012; Bouzat et al., 2004, 2008; Nemezc et al., 2016; Thompson et al., 2010).

4.4.4. Dominio intracelular

El ICD está conformado por dos *loops* citoplasmáticos: un *loop* corto entre M1 y M2 (de \sim 8 aminoácidos), y un *loop* grande entre M3 y M4. El *loop* M1-M2 está relativamente conservado, mientras que el *loop* M3-M4 es la región más divergente entre las diferentes subunidades nicotínicas tanto en términos de longitud (desde 80 a 260 aminoácidos) como de secuencia (Ferns, 2021; Stokes et al., 2015). Avances recientes en el campo de la biología estructural han aumentado considerablemente el número de estructuras resueltas de pLGIC, pero ninguna incluye al ICD completo, debido a que estos receptores a menudo se diseñaron reemplazando el ICD nativo con péptidos más cortos para aumentar la calidad de la estructura (Noviello et al., 2021). A pesar de estas dificultades, se sabe que la estructura del *loop* M3-M4 consiste en un *loop* corto post-M3, una hélice α denominada MX (de \sim 13 aminoácidos) que se encuentra paralela al plano de la

membrana, una región intermedia desordenada y pobremente conservada, y finalmente una hélice α larga llamada MA previa al segmento M4 (Figura 10B).

Las hélices MA de cada subunidad se extienden aproximadamente 40 Å hacia abajo desde la membrana plasmática y enmarcan un vestíbulo intracelular con forma de cono pentagonal invertido que posee cinco portales o ventanas, uno por cada interfaz MA-MA (Figura 10A y C). Los iones que atraviesan el canal iónico están obligados a pasar a través de estos portales. Cada una de estas ventanas tiene un tamaño aproximado de 8 Å (similar al tamaño de Na^+ y K^+ hidratados) y está enmarcada por residuos cargados negativamente (Figura 10C), garantizando de esta manera el paso selectivo de cationes a su través e impidiendo el paso de aniones o de iones de mayor tamaño (Ferns, 2021; Thompson et al., 2010; Unwin, 2005, 2013).

Esta región formada por las hélices MA posee gran importancia en la conductancia (velocidad de paso de los iones) de los receptores *Cys-loop*, como fue demostrado por primera vez en el 5HT_{3A}R (receptor de 5-HT tipo 3 subtipo A). Este receptor homomérico posee una conductancia muy baja (0,4 pS) por lo que sus corrientes unitarias no pueden resolverse. Sin embargo, el receptor heteromérico, formado por subunidades A y B posee una conductancia mayor (16 pS) que permite su detección a nivel de canal único. La diferencia en la conductancia se debe a que la subunidad A posee tres argininas (cargas positivas) en MA mientras que la subunidad B tiene residuos polares y/o cargados negativamente (Hales et al., 2006; Kelley et al., 2003; Peters et al., 2010). En el ICD del nAChR $\alpha 7$ los tres aminoácidos homólogos son polares y/o con carga negativa (Q428, E432 y S436), por lo que el receptor posee alta conductancia unitaria. La relevancia de los portales laterales para la permeación de iones ha sido documentada por un estudio en el que mutaciones de los residuos del portal lateral de $\alpha 7$ causaron una disminución (Q428A, S431A y E432A) o un aumento (H298A y R424A) en las corrientes en comparación con el salvaje (Bondarenko et al., 2022; Castelán et al., 2007). Más aún, en $\alpha 7$, la triple mutación a argininas produce un receptor que muestra una disminución muy marcada en la amplitud de los canales unitarios (N. Andersen et al., 2013a).

Recientemente, en un trabajo que combina experimentos de resonancia magnética nuclear y resonancia de espín de electrones con cálculos de Rosetta se ha determinado la estructura del ICD completo del nAChR $\alpha 7$ humano en un estado de reposo (Bondarenko et al., 2022). La región intermedia entre MX y MA, denominada *loop L* por los autores, alberga tres hélices cortas (h1, de 5 residuos; h2, de 3 residuos; y h3, de 7 residuos)

(Figura 10B). La hélice α h3 en el medio del *loop* L está anclada en la hélice MA a través de interacciones electrostáticas y de *Van der Waals*, dividiendo el *loop* L en dos *loops* más pequeños con forma de "B" (Figura 10 B) y aumentando así la estabilidad del *loop* L. La presencia de regiones desordenadas y la flexibilidad que presenta el *loop* L pueden ser necesarias para que el ICD se adapte a diferentes funciones (Bondarenko et al., 2022).

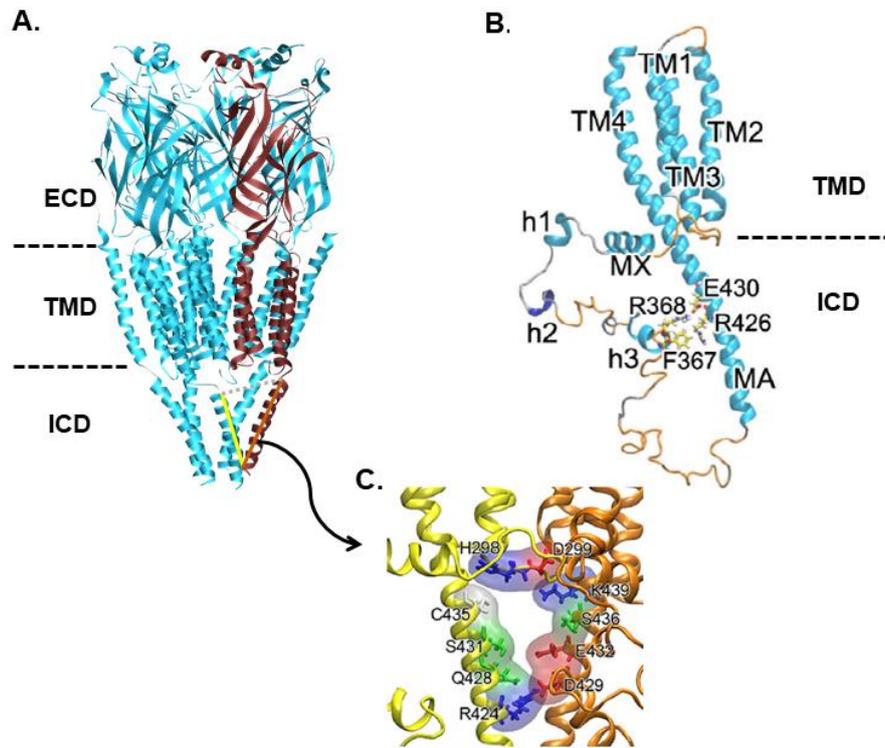


FIGURA 10. ICD de los nAChR.

(A) En el modelo tridimensional del nAChR muscular de *T. marmorata*, (PDB: 2BG9) se señalan los tres dominios funcionales (ECD, TMD e ICD). En el ICD de este modelo solo se muestra la hélice α MA. Con un triángulo se delimita un portal formado por dos hélices MA adyacentes.

(B) Se muestra la estructura tridimensional del TMD e ICD de una subunidad del nAChR $\alpha 7$ en estado cerrado (Bondarenko et al., 2022). En el TMD se señalan los 4 segmentos transmembrana (TM1-TM4); mientras que en el ICD se muestra el giro post-M3, la hélice MX, las hélices h (1-3) y la hélice MA. La región comprendida entre MX y MA se denomina *loop* L, el cual se asocia a MA por interacciones entre residuos de h3 y MA (señalados en la figura) dándole al *loop* L la forma de "B". El código de color se corresponde con la estructura secundaria: en celeste las hélices α (TM1-TM4, MX, h1, h3 y MA), en azul la hélice 3_{10} (h2), en naranja los giros y en plateado las regiones enrolladas o "*coil*". Modificado de (Bondarenko et al., 2022).

(C) Se muestra con gran aumento un portal formado entre dos hélices MA de subunidades adyacentes del nAChR $\alpha 7$ en estado cerrado (Bondarenko et al., 2022). Los residuos que lo forman están numerados según (Bondarenko et al., 2022) y sus cadenas laterales se muestran en barras con códigos de color: rojo para residuos con carga positiva, azul para residuos con carga negativa,

verde para residuos hidrofílicos y blanco para residuos hidrofóbicos. Modificado de (Bondarenko et al., 2022).

Comparado con el ECD y el TMD, el ICD está involucrado en funciones mucho más divergentes. Desempeña un papel fundamental en el tráfico, la localización y el ensamblaje de los receptores (Ferns, 2021; Kracun et al., 2008). Además, el ICD no solo afecta la conductancia del canal, sino también la desensibilización. El ICD media en las interacciones receptor-receptor (S. Li et al., 2012) y en las interacciones con proteínas intracelulares que regulan diversas vías de señalización río abajo (King et al., 2015). Se ha demostrado que el ICD tiene residuos que pueden sufrir procesos de fosforilación/desfosforilación por acción de quinasas y fosfatasas, además puede interaccionar con proteínas del citoesqueleto, proteínas G y sensores de Ca^{2+} , modulando la actividad del receptor (Ahmad et al., 2019; Bondarenko et al., 2022; Charpantier et al., 2005; Cho et al., 2005; Elnagar et al., 2018; Kuo et al., 2005; Nemezc et al., 2016). Por ello, ha sido reconocido como un blanco potencial para el diseño de fármacos (Stokes et al., 2015).

4.5. Estados conformacionales asociados a la activación del canal

Los nAChR operan como convertidores de una señal química (ACh, colina, nicotina) en una señal eléctrica (flujo de cationes a través del poro), y su diseño molecular se ha ajustado para funcionar como un interruptor de encendido y apagado que responde a la ACh. Según el modelo de Monod-Wyman-Changeux, la respuesta funcional puede interpretarse como una selección de unos pocos estados conformacionales discretos que, considerando el grado de afinidad por el ligando y la capacidad de conducir iones, se clasifican en tres clases: estado cerrado, estado abierto y estado desensibilizado (Figura 11). El mecanismo de activación es complejo ya que hay múltiples estados de cada clase principal y estados intermedios entre los estados cerrado y abierto, y abierto y desensibilizado. El número de estados conformacionales en cada clase principal y las tasas de transición entre estados definen la cinética del canal, que es única para cada subtipo de nAChR y ligando (Changeux y Christopoulos, 2016). Los cambios en la cinética originados por mutaciones conducen a canalopatías.

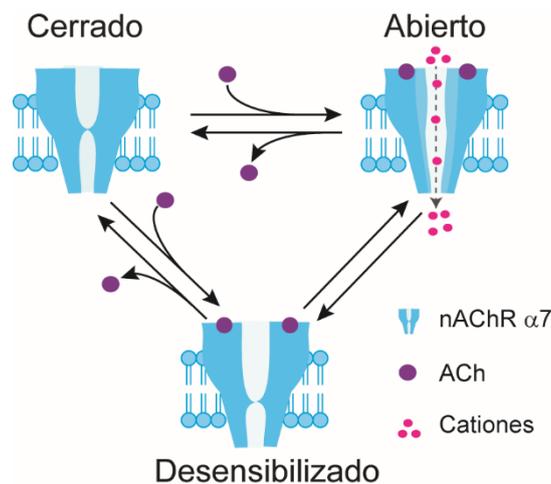


FIGURA 11. Estados conformacionales de los nAChR.

Modelo mínimo de activación de nAChR que muestra las tres clases principales de estados conformacionales: cerrado, abierto y desensibilizado. La unión del agonista estabiliza los estados conformacionales abierto y desensibilizado. En el estado cerrado la compuerta de activación está cerrada, mientras que en el estado desensibilizado está cerrada la compuerta de desensibilización.

En ausencia de agonista, el receptor se encuentra principalmente en estado de reposo cerrado. Aquí, la afinidad por el ligando ortostérico es baja y la compuerta de activación está cerrada, lo que impide el pasaje de los cationes (estado no conductor) (Figura 11).

Se han identificado estados cerrados preactivados intermedios donde el ligando se une con alta afinidad al receptor, llamados estados *flipped* (Lape et al., 2008) o *primed* (Mukhtasimova et al., 2009), que median la transición entre los estados cerrado y abierto. Estos estados intermedios son no conductores ya que los cambios conformacionales ocurren solo en el ECD sin involucrar al poro iónico. La capacidad de un agonista para cambiar la conformación del receptor del estado cerrado a un estado intermedio o preactivado se relaciona con su eficacia (Lape et al., 2008; Mukhtasimova et al., 2009).

La unión del agonista al receptor promueve el paso del estado cerrado a un estado intermedio que, por un proceso denominado gatillado o *gating*, desencadena la apertura de la compuerta del canal, dejando al receptor en estado abierto. Este estado tiene alta afinidad por el ligando ortostérico y presenta el poro iónico abierto permitiendo el paso de cationes (estado conductor) (Figura 11).

El proceso comienza con la unión del agonista al sitio ortostérico en el ECD donde interacciona con los residuos aromáticos e hidrofóbicos de las caras principal y complementaria. Para los nAChR el farmacóforo incluye un nitrógeno catiónico, que se

asocia con la cara principal por una interacción catión- π , y un aceptor de puente de hidrógeno que interacciona con la cara complementaria.

Una vez que se ha unido el agonista tiene lugar la primera de dos transiciones alostéricas sucesivas, llamada *unblooming*, que consiste en el movimiento de los ECD de las subunidades radialmente hacia el eje Z y tangencialmente en sentido antihorario, lo que da como resultado una compactación de las estructuras β -sandwich (F. Gao et al., 2005; Law et al., 2005; Noviello et al., 2021; Taly et al., 2005; Zhao et al., 2021). En este proceso, el *loop C* rota hacia la cavidad o bolsillo del sitio de unión ortostérico y se cierra sobre la molécula de agonista unida (atrapamiento o *capping*), siendo este un evento que se asocia con el cebado o *priming* y la apertura del canal (Mukhtasimova et al., 2009; H. L. Wang et al., 2009). Se ha sugerido que los agonistas completos inducen conformaciones más compactas del *loop C*, mientras que los antagonistas y los agonistas parciales producen un cierre incompleto o lo previenen (Brams et al., 2011; Hansen et al., 2005; Hibbs et al., 2009).

Los cambios conformacionales en el ECD se propagan al TMD a través de la región de acoplamiento. El *loop* $\beta 1$ - $\beta 2$ se mueve hacia abajo, y el *cys-loop* junto al *loop* M2-M3 se alejan del eje Z, generando la redistribución de las cadenas laterales de varios aminoácidos del TMD (Bocquet et al., 2008; C. J. B. daCosta y Baenziger, 2013; R. J. C. Hilf y Dutzler, 2008; Nemezc et al., 2016). De esta manera, los cambios en el ECD se acoplan con la segunda transición alostérica, denominada *twisting*, que consiste en la rotación concertada en sentido opuesto del ECD con respecto al TMD sobre el eje Z. Esta rotación-inclinación de las hélices α del TMD desestabiliza las interacciones en los anillos hidrofóbicos de M2 lo que da como resultado la apertura de la compuerta de activación (Althoff et al., 2014; Bocquet et al., 2008; Calimet et al., 2013; R. J. C. Hilf y Dutzler, 2008; Nemezc et al., 2016; Noviello et al., 2021; Sauguet et al., 2014; Taly et al., 2005; Zhao et al., 2021).

El receptor abierto unido al agonista puede sufrir una transición hacia estados no conductores por desactivación o por desensibilización. La desactivación es un proceso en el cual el agonista unido se disocia, por lo que el receptor regresa al estado conformacional cerrado. Bajas concentraciones del agonista, cortos períodos de exposición y baja afinidad del receptor por el ligando, favorecen al proceso de desactivación. Por otro lado, la desensibilización es un proceso en el cual el receptor pasa del estado abierto al desensibilizado, que es un estado conformacional no conductor donde el ligando se

mantiene unido al sitio ortostérico con alta afinidad (Figura 11). Este proceso se ve favorecido ante elevadas concentraciones del agonista y/o tiempos prolongados de exposición al mismo.

Por estudios funcionales de mutagénesis se han dilucidado diferentes regiones del receptor involucradas en la desensibilización: ECD, región de acoplamiento, TMD e ICD (Bouzat et al., 2008; Gielen y Corringer, 2018; Quick y Lester, 2002; Revah et al., 1991; J. Zhang et al., 2013b). En los últimos años se han obtenido estructuras cristalinas de pLGIC aniónicos en estado desensibilizado unido a agonista. En ellas se observa la compuerta de activación abierta y un estrechamiento de carácter hidrofóbico próximo al extremo intracelular del poro iónico a la altura del filtro de selectividad que actuaría como la compuerta de desensibilización (Gielen et al., 2015; Gielen y Corringer, 2018; X. Huang et al., 2017; Laverty et al., 2017; Miller y Aricescu, 2014). La transición alostérica que lleva al estado desensibilizado implica un cambio estructural global luego de la activación. El extremo superior de las hélices del TMD hace un movimiento que expande el poro a ese nivel, a la vez que estrecha el extremo citoplasmático. Esto cierra la compuerta de desensibilización manteniendo abierta la compuerta de activación. Se sugiere que la región de acoplamiento también sufre cambios estructurales, mientras que el ECD no se modifica de forma significativa, lo que le permite mantener la alta afinidad por el agonista que caracteriza al estado desensibilizado (Bouzat et al., 2008; Q. Wang y Lynch, 2011; Yamodo et al., 2010; J. Zhang et al., 2013b).

Curiosamente, la estructura cristalina recientemente resuelta del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en estado desensibilizado (Morales-Perez et al., 2016) muestra que la constricción a nivel intracelular del poro no es de carácter hidrofóbico, como en los pLGIC aniónicos, sino que es hidrofílica y cargada negativamente. Además, los residuos presentes en esa región tienen movilidad y pueden rotar ensanchando el diámetro del poro. Por lo tanto, aún no se puede explicar de qué manera esta compuerta de desensibilización del receptor $\alpha 4\beta 2$ logra impedir el pasaje de los cationes (Gielen y Corringer, 2018).

Por último, en el estado desensibilizado del nAChR $\alpha 7$ humano, el poro iónico tiene forma de embudo, con un estrechamiento polar en el extremo intracelular en posición -1' (Figura 12) (Noviello et al., 2021), similar a la compuerta de desensibilización del nAChR $\alpha 4\beta 2$ (Morales-Perez et al., 2016). Una particularidad de $\alpha 7$ es que el poro en el estado desensibilizado también está parcialmente estrechado en la posición 9' (en el estado cerrado en reposo L9' es la compuerta de activación). En este estrechamiento parcial, el

diámetro del poro y la hidrofobicidad en L9' representan una barrera potencial para los cationes hidratados (Figura 12). Mientras que el residuo L9' forma la compuerta de activación en reposo de todos los receptores *Cys-loop*, solo en $\alpha 7$ contribuye también con la compuerta de desensibilización (Noviello et al., 2021). Como esta constricción en L9' no se ve en otras estructuras en estado desensibilizado, se sugiere que el cierre parcial en esta compuerta de L9' tiene un rol en la desensibilización excepcionalmente rápida de $\alpha 7$, con contribuciones adicionales del ECD (Gay et al., 2008; McCormack et al., 2010) y de la región de acoplamiento (Bouzat et al., 2008).

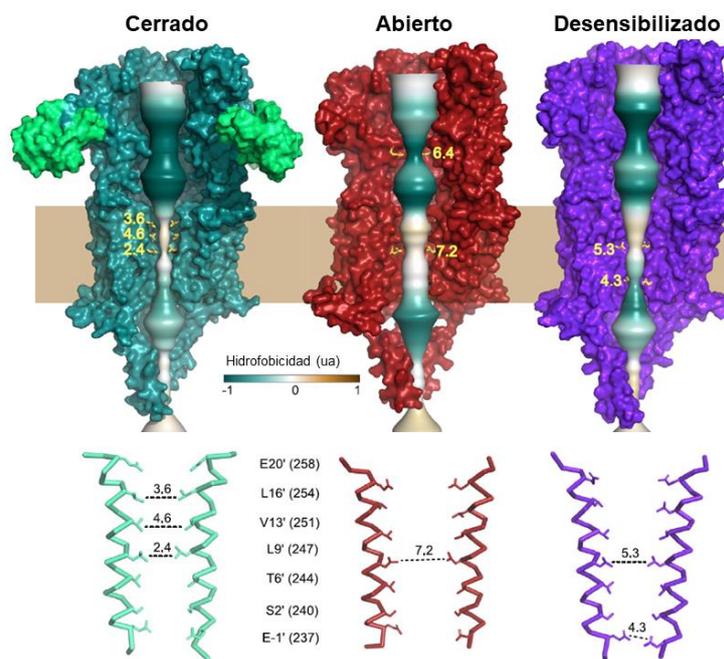


FIGURA 12. Vía de permeación de iones en tres estados conformacionales del nAChR $\alpha 7$.

Se muestran modelos tridimensionales de las vías de permeación para tres estados conformacionales del nAChR $\alpha 7$ según (Noviello et al., 2021): cerrado por unión a α -BTX (izquierda, α -BTX en verde claro); abierto por unión a epibatidina y PNU-120596 (medio); y desensibilizado por unión a epibatidina (derecha). Las vías de permeación de los iones están representadas por una superficie sólida coloreada por hidrofobicidad. Los puntos de constricción se indican en amarillo con distancias en Å. Debajo, para cada uno de los estados conformacionales se muestran dos hélices M2 con las cadenas laterales de los residuos que forman el poro. Los diámetros de los estrechamientos se indican con línea punteada, y las distancias están expresadas en Å. La constricción en L9' en el estado desensibilizado es una particularidad del nAChR $\alpha 7$. Modificado de (Noviello et al., 2021).

4.6. Modulación farmacológica

El término alostérico hace referencia a la interacción entre componentes de un complejo molecular, donde la acción de uno genera un efecto en el otro. La unión de un ligando generando una respuesta del efector que forma parte del complejo es una acción alostérica, por ejemplo, la unión del agonista a un pLGIC produce la apertura de la compuerta del canal dejando pasar iones.

El concepto inicial de alosterismo indicaba la transición de una molécula entre sus estados inactivo y activo provocada exclusivamente por la unión de otra molécula integrante del complejo (receptor-agonista) (Del Castillo y Katz, 1957). El modelo de Monod, Wyman y Changeux introdujo una modificación a este concepto al proponer que la molécula principal (por ejemplo, un receptor) puede transitar por los estados activo e inactivo tanto en presencia como ausencia de la molécula accesoria (por ejemplo, el agonista), y que la unión del ligando estabilizaría aquellos estados de mayor afinidad por el mismo (Monod et al., 1965). En el caso de un receptor, la unión del ligando estabilizará el estado abierto. Este modelo fue confirmado por la observación de aperturas espontáneas, aunque con muy baja probabilidad, en ausencia de agonista. Si bien este modelo fue inicialmente desarrollado para estudiar reacciones enzimáticas, fue adecuado también para interpretar el comportamiento de receptores como los nAChR (Karlin, 1967).

Como se ha comentado anteriormente, se sabe que el nAChR puede coexistir en sus diferentes estados (cerrado, abierto y desensibilizado), y que la unión de agonistas estabiliza el estado abierto, mientras que la de antagonistas el estado cerrado. Según el sitio que ocupen estos agentes moduladores en el receptor será el mecanismo utilizado para generar su acción. De esta manera, se definen como moduladores competitivos cuando dichas moléculas se unen al mismo sitio que el agonista endógeno (sitio ortostérico), y moduladores no competitivos si se unen a sitios diferentes respecto del sitio ortostérico (sitio alostérico). Los ligandos que actúan sobre el sitio ortostérico (ligandos ortostéricos) pueden ser agonistas o antagonistas. En tanto, que aquellos que actúan sobre sitios alostéricos (ligandos alostéricos) pueden ser moduladores alostéricos, ya sea positivos, negativos o silentes, o agonistas alostéricos (Figura 13).

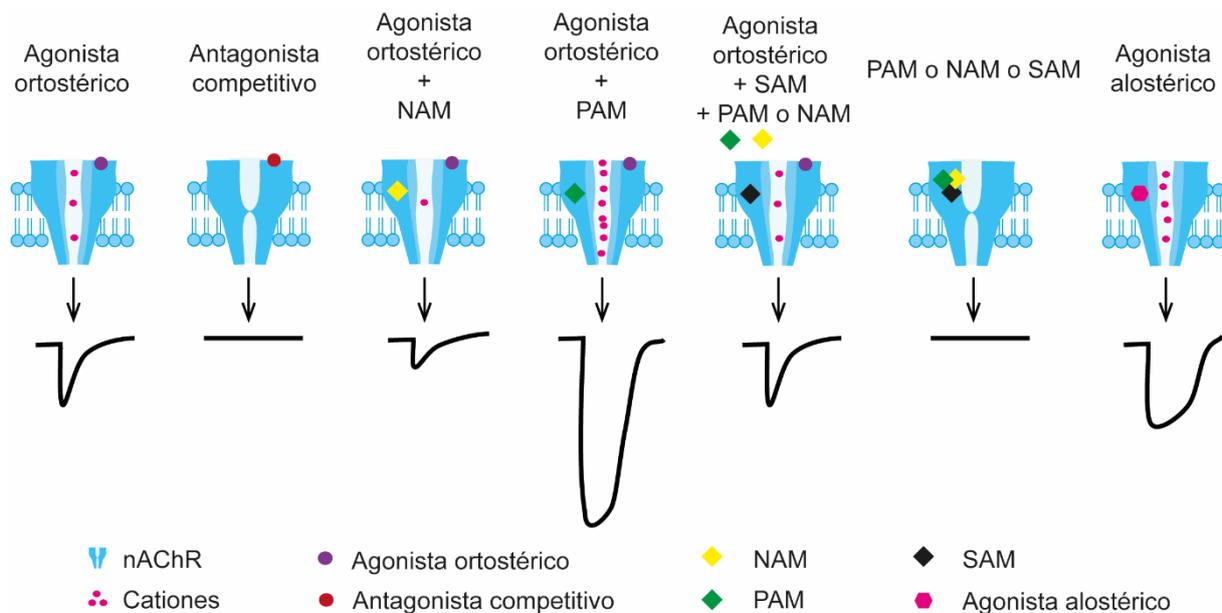


FIGURA 13. Modulación farmacológica de los nAChR por distintos tipos de ligando.

El esquema muestra distintos tipos de modulación farmacológica de los nAChR por ligandos ortostéricos y alostéricos, y algunas de sus posibles combinaciones. La localización del sitio de acción de cada uno es ilustrativa. Por debajo de cada combinación de receptor y ligando se muestra la respuesta macroscópica esperada.

4.6.1. Ligandos ortostéricos

4.6.1.1. Agonistas ortostéricos

Son ligandos que se unen al nAChR en el sitio de unión ortostérico y disparan su activación (Figura 13). Pueden ser agonistas completos, si provocan la máxima actividad o respuesta del receptor, o parciales, si presentan menor eficacia que los primeros. Si bien ambos tipos estabilizan la misma conformación abierta del receptor al unirse al sitio ortostérico, los agonistas parciales son menos efectivos en favorecer los cambios conformacionales para pasar del estado cerrado al estado intermedio (Lape et al., 2008; Mukhtasimova et al., 2009). Para definir a un agonista nicotínico como completo o parcial se ha considerado la actividad ionotrópica de los receptores. Recientemente se han identificado agonistas parciales muy ineficientes para activar al canal iónico, pero que estabilizan el estado no conductor desensibilizado del receptor, activando vías de señalización intracelular (actividad metabotrópica). Estos agonistas, con respuesta ionotrópica casi nula, pero que tienen respuestas metabotrópicas notorias se han

denominado agonistas silentes (Blunt y Dougherty, 2019; Chojnacka et al., 2013; Papke et al., 2015; Papke y Lindstrom, 2020).

Los nAChR son activados por una gran cantidad de compuestos, desde productos naturales hasta compuestos sintéticos que actúan como agonistas completos o parciales. El farmacóforo del agonista de los nAChR presenta un átomo de nitrógeno catiónico (cuaternario) que interactúa con la cara principal del sitio ortostérico. La presencia de un aceptor de puente de hidrógeno para interactuar con la cara complementaria es importante, aunque no indispensable.

Además del agonista endógeno, ACh, y sus derivados de cadena lineal, como la colina y la succinilcolina, existe una gran variedad de alcaloides heterocíclicos que son agonistas de los nAChR. El alcaloide (-)-nicotina, extraído de las hojas de la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*), es el agonista prototípico para determinar la clasificación farmacológica de la familia. Activa todos los subtipos de nAChR, excepto los que contienen la subunidad $\alpha 9$, y muestra una afinidad y eficacia notablemente altas por $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$. La epibatidina, un alcaloide bicíclico obtenido de la piel de rana del Amazonas (*Epipedobates anthonyi*), es uno de los agonistas no selectivos más potentes. La (-)-citisina, un alcaloide tricíclico de quinolizidina que se encuentra en las plantas de la familia *Leguminosae*, tiene alta afinidad por $\alpha 4\beta 2^*$, y se utiliza para dejar de fumar y para tratar la depresión. Por otro lado, existen muchos compuestos sintéticos con diferente selectividad hacia los nAChR. Por ejemplo, el PNU-282987 (N-[(3'R)-1'-azabicyclo[2.2.2]oct-3'-il]-4-clorobenzamida) se ha desarrollado para la activación selectiva del receptor $\alpha 7$ (Bodnar et al., 2005).

4.6.1.2. Antagonistas ortostéricos (competitivos)

Son ligandos que se unen al nAChR en el sitio de unión ortostérico, pero que no provocan su activación (Figura 13). Las interacciones que establece un antagonista competitivo en el sitio ortostérico son diferentes a la de un agonista. Por ejemplo, luego de la unión de un antagonista, la incapacidad para activar al receptor podría estar relacionada con la ausencia del cierre del *loop C* de la cara principal (C. J. B. daCosta y Baenziger, 2013; R. Hurst et al., 2013).

Algunos antagonistas de los nAChR se utilizan en la clínica como bloqueadores musculares, por ejemplo, la d-tubocurarina que tiene gran afinidad por el nAChR muscular, se usa para la relajación muscular durante la cirugía o la ventilación mecánica.

Hay una serie de toxinas obtenidas de venenos de animales que interactúan específicamente con los nAChR y muestran selectividad de subtipos. La α -BTX, aislada del veneno de una serpiente taiwanesa (*Bungarus multicinctus*), muestra una unión pseudoirreversible a los nAChR muscular y $\alpha 7$. Las α -conotoxinas son una serie de péptidos, de 12 a 19 aminoácidos, producidos por caracoles marinos que actúan como potentes antagonistas de los nAChR y han servido como herramientas útiles para la identificación de subtipos (Kasheverov et al., 2022). El alcaloide metillicaconitina (MLA), aislado de las plantas del género *Delphinium*, es un antagonista competitivo selectivo del nAChR $\alpha 7$.

4.6.2. Ligandos alostéricos

Las respuestas de los nAChR pueden ser moduladas por diversas moléculas que se unen a sitios distintos del sitio ortostérico, llamados sitios alostéricos. Los ligandos alostéricos modifican las barreras energéticas de las transiciones entre estados conformacionales y, por lo tanto, potencian o inhiben la función del receptor. Son herramientas terapéuticas prometedoras porque mantienen las características espaciales y temporales de la activación endógena; muestran una alta selectividad, ya que los sitios ortostéricos están más conservados que los alostéricos; y permiten una alta diversidad estructural.

Desde un enfoque funcional, los ligandos alostéricos se clasifican como: (i) moduladores alostéricos negativos (NAM, *Negative Allosteric Modulator*); (ii) moduladores alostéricos positivos (PAM, *Positive Allosteric Modulator*); (iii) moduladores alostéricos silentes (SAM, *Silent Allosteric Modulator*); y (iv) agonistas alostéricos.

4.6.2.1. Moduladores alostéricos negativos

Son ligandos que al unirse a un sitio alostérico del receptor disminuyen la respuesta evocada por un agonista ortostérico por medio de diferentes mecanismos (Figura 13). Los NAM pueden estabilizar el nAChR en un estado cerrado en reposo al incrementar la barrera energética entre el estado cerrado y el abierto, dificultando la activación por parte del agonista ortostérico; o también pueden aumentar la velocidad de desensibilización. La inhibición también puede ocurrir a través del bloqueo de canales abiertos en los que el fármaco bloquea físicamente el flujo de iones.

Los NAM que actúan en diferentes subtipos de nAChR incluyen compuestos endógenos, como esteroides, y muchos otros que tienen otros blancos principales, como anestésicos, bloqueadores de Ca^{2+} , antipsicóticos y antidepresivos. Los NAM pueden ser terapéuticamente beneficiosos, por ejemplo, la quinidina y la fluoxetina son eficaces para acortar las aperturas prolongadas del nAChR muscular en los síndromes miasténicos congénitos de canal lento; el bromuro de hexametonio, un bloqueador de canales abiertos, se ha utilizado como bloqueador de los nAChR ganglionares para tratar la hipertensión; y las NAM de $\alpha 4\beta 2^*$ muestran efectos antidepresivos.

Existen algunos NAM selectivos del nAChR $\alpha 7$ que son derivados de un PAM del receptor como el TQS (4-naftalen-1-il-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinoline-8-sulfónico amida): 2,3,6MP-TQS y 2,6MP-TQS (Gill-Thind et al., 2015).

4.6.2.2. Moduladores alostéricos positivos

Son ligandos que al unirse a un sitio alostérico del receptor potencian la respuesta evocada por un agonista ortostérico por medio de diferentes mecanismos (Figura 13). Los PAM pueden alterar las barreras de energía entre los estados de cerrado/abierto y abierto/desensibilizado y pueden mejorar la potencia y/o eficacia del agonista.

Para $\alpha 7$, los PAM se clasifican en dos tipos (I y II) en base al mecanismo molecular por el cual inducen la potenciación (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Chatzidaki y Millar, 2015). Los PAM tipo I potencian las corrientes macroscópicas inducidas por agonistas, lo que se visualiza por un incremento del pico máximo de la corriente sin modificación de la desensibilización (Figura 14A). Estos compuestos actúan disminuyendo la barrera energética entre el estado cerrado y el abierto del receptor, y/o aumentando la barrera energética entre el estado abierto y el desensibilizado. Por su parte, los PAM tipo II no solo incrementan el pico máximo de las corrientes macroscópicas, sino que también reducen notoriamente la velocidad de desensibilización (Figura 14A). Actúan reduciendo la estabilidad del estado desensibilizado del receptor, por lo cual disminuyen la barrera energética entre el estado desensibilizado y el abierto, provocando una menor velocidad de desensibilización y/o un aumento en la recuperación desde el estado desensibilizado (N. D. Andersen et al., 2016; Bertrand y Gopalakrishnan, 2007; Grønlien et al., 2007). A nivel de corrientes unitarias, los PAM incrementan la duración del canal abierto e inducen la activación en episodios en los que el canal oscila entre conformaciones abiertas y

cerradas, generando así un patrón de actividad marcadamente diferente al de las aperturas aisladas breves (submilisegundos) en ausencia de PAM (Figura 14B)

La naturaleza química de los PAM de $\alpha 7$ es muy variada e incluye iones, como Ca^{2+} ; compuestos endógenos; compuestos naturales, como los flavonoides; y compuestos sintéticos (Chatzidaki y Millar, 2015). Los prototipos de PAM tipo I y II para $\alpha 7$ son el 5-hidroxiindol (5-HI) y el PNU-120596 (N-(5-cloro-2,4-dimetoxifenil)-N'-(5-metil-3-isoxazolil)-urea), respectivamente (R. S. Hurst et al., 2005; Zwart et al., 2002).

4.6.2.3. Moduladores alostéricos silentes

Son ligandos que al unirse a un sitio alostérico del receptor no tienen efecto sobre las respuestas de los agonistas ortostéricos, pero bloquean la acción de los NAM, PAM y agonistas alostéricos al competir por el sitio alostérico de unión (Figura 13).

Existen algunos SAM selectivos del nAChR $\alpha 7$ que son derivados del TQS: 2,3,5,6MP-TQS y 2,4MP-TQS (Gill-Thind et al., 2015).

4.6.2.4. Agonistas alostéricos

Son ligandos que al unirse a un sitio alostérico del receptor provocan su activación en ausencia de un agonista ortostérico (Figura 13). El mecanismo molecular por el cual se da esta activación es diferente al de la activación ortostérica. Los agonistas alostéricos actúan como PAM, generalmente de tipo II, si se combinan con agonistas ortostéricos, por lo que también son llamados ago-PAM.

El prototipo de agonista alostérico del nAChR $\alpha 7$ es el 4BP-TQS (4-(4-bromophenyl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinoline-8-sulfonamida) (Gill et al., 2011).

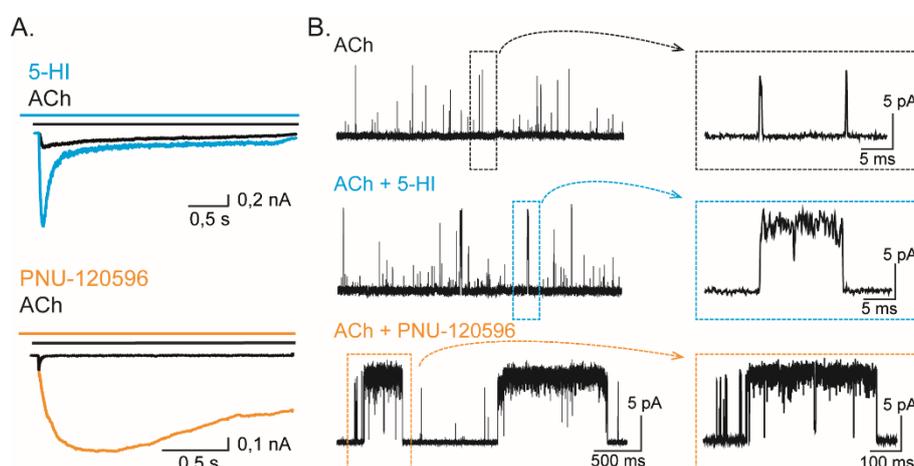


FIGURA 14. Modulación de las corrientes microscópicas y macroscópicas de $\alpha 7$ nAChR por PAM tipo I y II.

(A) Corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ provocadas por ACh 50 μM en ausencia (trazo negro) o presencia de 5-HI 2 mM (trazo celeste), PAM de tipo I que solo aumenta la corriente máxima; o PNU-120596 1 μM (trazo naranja), PAM de tipo II que también disminuye la desensibilización.

(B) Se muestran trazos de registros de canal único de $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia (arriba) y en presencia de 5-HI 2 mM (medio) o PNU-120596 1 μM (naranja). Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

5. Receptor nicotínico $\alpha 7$

5.1. nAChR $\alpha 7$ neuronal

El receptor $\alpha 7$ se expresa principalmente en regiones que están implicadas en funciones cognitivas y de memoria, como el hipocampo, la corteza cerebral y varias regiones límbicas subcorticales (Bouzat et al., 2018; Lendvai et al., 2013), aunque también se ha encontrado en bajos niveles en regiones talámicas y ganglios basales (Poisik et al., 2008).

De forma similar a otros nAChR neuronales, $\alpha 7$ puede hallarse en las neuronas en distintas localizaciones: postsináptica, presináptica, perisináptica y extrasináptica. A nivel postsináptico los receptores $\alpha 7$ median la transmisión sináptica rápida en distintos circuitos neuronales, pero las principales funciones neuromoduladoras en el SNC las ejerce en las demás localizaciones. A nivel presináptico el influjo de Ca^{2+} por el receptor facilita la liberación de NT, principalmente en neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas, y en menor medida, en neuronas que liberan DA, NA y ACh (Albuquerque et al., 2009). El nAChR $\alpha 7$ perisináptico es capaz de potenciar o inhibir el efecto de otros NT sobre sus receptores excitatorios o inhibitorios respectivamente al modular la excitabilidad de la neurona postsináptica, además, el receptor es capaz de mediar diversos procesos de señalización por transmisión extrasináptica (Corradi y Bouzat, 2016b; Fabian-Fine et al., 2001; I. W. Jones y Wonnacott, 2004; Lendvai et al., 2013; Papke, 2014; Sinkus et al., 2015). De esta manera, $\alpha 7$ media el rol neuromodulador de la ACh en los circuitos neuronales que controlan procesos de cognición, memoria, aprendizaje, atención, vías de recompensa y procesamiento de la información sensorial.

Se ha demostrado que potenciar la actividad de $\alpha 7$ mejora la atención, el rendimiento cognitivo y la resistencia neuronal a las lesiones (Uteshev, 2014). Por otro

lado, la disfunción de la señalización colinérgica mediada por $\alpha 7$, particularmente en hipocampo, se ha asociado a la enfermedad de Alzheimer y a la esquizofrenia (Bouzat et al., 2018; Corradi y Bouzat, 2016b; Dineley et al., 2015; T. Yang et al., 2017). El gen $\alpha 7$ (CHRNA7), ubicado en el cromosoma 15, está genéticamente relacionado con múltiples trastornos con déficits cognitivos, como la esquizofrenia, la discapacidad intelectual, el trastorno bipolar, los trastornos del espectro autista, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y el déficit de procesamiento sensorial (Corradi y Bouzat, 2016b; Dineley et al., 2015; Sinkus et al., 2015).

5.2. nAChR $\alpha 7$ extraneuronal

Además de encontrarse en neuronas, el receptor $\alpha 7$ se expresa en una gran variedad de células no neuronales, como las gliales, inmunitarias y epiteliales, cumpliendo funciones muy diversas.

La expresión del receptor es importante en células gliales, incluidos astrocitos, microglía y células precursoras de oligodendrocitos (Corradi y Bouzat, 2016b; Dineley et al., 2015). Se ha demostrado la existencia de una vía colinérgica cerebral que regula la activación microglial a través de $\alpha 7$ (Shytle et al., 2004). Esta vía es fundamental para la neuroprotección (Park et al., 2007) y probablemente sea importante en la enfermedad de Parkinson, la privación de oxígeno y glucosa, y la isquemia (Y. Z. Guan et al., 2015; Parada et al., 2013; Stuckenholtz et al., 2013).

Por otro lado, $\alpha 7$ está presente en varios tipos de células inmunitarias, incluidos los linfocitos (T, B y NK), células dendríticas y macrófagos (Corradi y Bouzat, 2016b; Egea et al., 2015; Zanetti et al., 2016). Aquí tiene un rol muy importante en la vía antiinflamatoria colinérgica, que es un vínculo entre las fibras eferentes vagales y el sistema inmunitario innato. En las células inmunitarias, $\alpha 7$ modula vías de señales intracelulares lo que da como resultado potentes efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias y la sobreexpresión de la hemooxigenasa 1 (Báez-Pagán et al., 2015; Egea et al., 2015).

Además, $\alpha 7$ está presente en muchos otros tipos de células no neuronales: células sanguíneas, queratinocitos, células epiteliales, fibroblastos, células del sistema digestivo, células pulmonares, espermatogonias, espermatocitos y células tubulares seminíferas y de Sertoli (Báez-Pagán et al., 2015; De Rosa et al., 2005; Kawashima y Fujii, 2004; Maus et al., 1998; Schirmer et al., 2011; Wessler y Kirkpatrick, 2008). El rol del receptor en

todos estos tipos celulares es un campo de intensa investigación, y se ha asociado a procesos de diferenciación, migración, adhesión, contacto celular, apoptosis y angiogénesis (Egea et al., 2015; Ni et al., 2010; Zdanowski et al., 2015).

En consecuencia, la potenciación de $\alpha 7$ ha surgido como una estrategia importante para la modulación de la inflamación en diferentes contextos patológicos, incluyendo sepsis, isquemia/reperfusión, artritis reumatoide y pancreatitis. Sin embargo, el aumento de la actividad de $\alpha 7$ en ciertas células podría contribuir a la progresión de cáncer a través de la promoción de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis y la estimulación de la angiogénesis tumoral (Hajiasgharzadeh et al., 2019; Pucci et al., 2021). Por lo tanto, la interferencia con la expresión de $\alpha 7$ o el tratamiento con inhibidores específicos puede revertir los efectos proangiogénicos de la nicotina e inhibir el crecimiento de células cancerosas (Pepper et al., 2017; C. H. Wu et al., 2011).

5.3. Actividad ionotrópica y metabotrópica del nAChR $\alpha 7$

La actividad ionotrópica de $\alpha 7$ presenta algunas características únicas que lo diferencian del resto de los nAChR. El receptor presenta una rápida activación, una rápida desensibilización (la de mayor velocidad entre todos los nAChR), una alta permeabilidad al Ca^{2+} , baja afinidad por ACh y nicotina, activación total por colina, y alta afinidad por α -BTX.

Las respuestas macroscópicas de $\alpha 7$ en función de la concentración del ligando dan como resultado una CE_{50} (concentración efectiva media) de 100 a 200 μM para ACh y de 18 a 91 μM para nicotina; y una CI_{50} (concentración inhibitoria media) de 1 a 100 nM para α -BTX (N. Andersen et al., 2013a; Wonnacott y Barik, 2007). Estas corrientes macroscópicas mediadas por el receptor $\alpha 7$ decaen rápidamente en presencia del agonista como resultado de la desensibilización. Con sistemas de perfusión rápidos, la constante de tiempo de desensibilización de $\alpha 7$ está por debajo del rango de ms, aunque el valor real podría ser incluso menor (Bouzat et al., 2008). A nivel de canal único, la actividad de $\alpha 7$ aparece como pulsos breves aislados (de 0,1-0,3 ms) flanqueados por largos períodos cerrados y, con menos frecuencia, como dos o tres pulsos breves en rápida sucesión (*burst*). Por lo tanto, $\alpha 7$ tiene una probabilidad de apertura muy baja.

La máxima activación de $\alpha 7$ es alcanzada con la unión de la ACh a un solo sitio ortostérico de los cinco que posee (N. Andersen et al., 2013a). Además, la ocupación de un solo sitio ortostérico por MLA o α -BTX es suficiente para inhibir la función del receptor

(C. J. B. daCosta et al., 2015; Palma et al., 1996). Aunque no existe un consenso general para un modelo cinético de $\alpha 7$, un aspecto interesante es que el patrón temporal de las corrientes individuales activadas por ACh es similar a 10 μM o 1 mM del NT (Bouzat et al., 2008). Esta falta de dependencia de la concentración, combinada con el hecho de que la mayoría de los episodios de activación del receptor consisten en una apertura simple con una duración similar a la constante de tiempo de desensibilización, sugiere que el principal mecanismo por el cual el canal pasa del estado abierto conductor a un estado no conductor es la desensibilización (Bouzat et al., 2008). Esto tiene consecuencias potenciales para la latencia entre respuestas en una sinapsis donde el pulso del NT es transitorio. La recuperación de la desensibilización depende de la concentración del agonista y de la duración de la exposición, ya que pueden existir diferentes estados de desensibilización. En $\alpha 7$ expresado en células HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), la recuperación de la desensibilización en ausencia de agonista se da con una constante de tiempo de ~ 1 segundo (Bouzat et al., 2008), mientras que se requieren de 15 a 30 segundos para la recuperación completa en el hipocampo (Frazier et al., 1998). Por lo tanto, después de una respuesta breve, se requiere una latencia de varios segundos para generar otra respuesta de amplitud completa.

Una característica muy distintiva de $\alpha 7$ es su elevada permeabilidad al Ca^{2+} , que es comparable a la de los receptores NMDA de Glu. La relación de permeabilidad $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ de $\alpha 7$ es de ~ 10 -20, siendo una de las más altas entre los nAChR (Fucile, 2017; Seguela et al., 1993). La alta permeabilidad al Ca^{2+} subyace a la mayoría de las funciones de $\alpha 7$: facilitación de la liberación de NT, despolarización de las células postsinápticas e iniciación de muchos procesos celulares a través de su acción como segundo mensajero (Gotti y Clementi, 2004).

Al influjo directo y transitorio de Ca^{2+} por la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ se le suma el Ca^{2+} que ingresa al interior celular por la activación de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje debido a la despolarización originada por la activación de $\alpha 7$. Además, al ingreso extracelular del catión se le acopla la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares por receptores de rianodina e inositol trifosfato, generando un incremento de Ca^{2+} de más larga duración (Bouzat et al., 2018; Corradi y Bouzat, 2016b; F. Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Egea et al., 2015; Guerra-Álvarez et al., 2015; Kabbani y Nichols, 2018). De esta manera, la activación rápida y transitoria (actividad ionotrópica) de $\alpha 7$ se transforma, gracias al aumento de Ca^{2+} intracelular, en un fenómeno sostenido a partir

del cual se disparan vías de señalización intracelular mediadas por MAPK/ERK, AKT/PKB, PKC, JAK2, entre otras (actividad metabotrópica).

Es importante resaltar que la actividad metabotrópica de $\alpha 7$ no depende exclusivamente del aumento Ca^{2+} intracelular, ya que el receptor, a través de su ICD, puede interactuar físicamente con diversas proteínas intracelulares y activar cascadas de señalización intracelular. Por ejemplo, en la primera mitad de la hélice MX existe un motivo de acoplamiento para MAPK (Bondarenko et al., 2022); entre MX y h1 hay una secuencia de aminoácidos (RMKR) que interaccionarían con proteínas G_{α} y $G_{\beta\gamma}$ para activar las vías de señalización río abajo que implican la liberación de Ca^{2+} intracelular mediada por fosfolipasa C e inositol trifosfato (King et al., 2015); un segmento en la hélice h3 es esencial para el transporte selectivo de $\alpha 7$ a las dendritas en neuronas del hipocampo (J. Xu et al., 2006); el ICD también interactúa con JAK2 y con quinasas de la familia de Src (Bondarenko et al., 2022; Charpantier et al., 2005; Kabbani et al., 2013; King et al., 2015; Shaw et al., 2002; K. Wang et al., 2004).

La vía JAK2/PI3K/AKT que se dispara tras la activación de $\alpha 7$ en algunas células promueve efectos antiinflamatorios y antioxidantes que son fundamentales para la neuroprotección (Kihara et al., 2001; Lendvai et al., 2013; Parada et al., 2013; Shaw et al., 2002). Además, al activarse JAK2 se produce la fosforilación y dimerización de STAT3 (factor de transcripción), que transloca al núcleo y favorece la respuesta antiinflamatoria, a la vez que se inhibe al factor de transcripción NF- κ B, reprimiendo de esta manera la expresión de genes proinflamatorios (De Jonge y Ulloa, 2007; Ren et al., 2017; Zanetti et al., 2016).

En definitiva, $\alpha 7$, originalmente catalogado como un receptor ionotrópico, es hoy en día considerado como un receptor dual ionotrópico-metabotrópico. La respuesta eléctrica transitoria generada por su actividad de canal iónico se prolonga en el tiempo en una respuesta más sostenida por activación de vías de señalización intracelular (Corradi y Bouzat, 2016b; Egea et al., 2015; Kabbani y Nichols, 2018). La activación y desensibilización extremadamente rápidas de $\alpha 7$ podrían ser un mecanismo para impedir el ingreso masivo de Ca^{2+} y la consecuente toxicidad celular, pero, la actividad metabotrópica del receptor, que puede ocurrir desde el estado desensibilizado, puede mantenerse en el tiempo. En células no neuronales, la respuesta metabotrópica de $\alpha 7$ parece ser la principal, sino la única, ya que solo se ha detectado actividad ionotrópica en macrófagos (Báez-Pagán et al., 2015).

5.4. Estrategias terapéuticas que tienen como blanco el nAChR $\alpha 7$

Como se comentó anteriormente, la disfunción de la actividad del nAChR $\alpha 7$ se ha asociado a diversos desórdenes neurodegenerativos, neurológicos, psiquiátricos e inflamatorios, lo que no resulta sorprendente si se considera el rol fundamental que cumple el receptor a nivel del SNC, pero también fuera de este. Las acciones neuromoduladoras, neuroprotectoras y antiinflamatorias sistémicas de $\alpha 7$ junto a sus propiedades únicas de activación, desensibilización, permeabilidad al Ca^{2+} y rol dual ionotrópico-metabotrópico, han hecho del receptor un blanco farmacológico emergente muy importante en enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, esquizofrenia, trastorno de déficit de atención e hiperactividad, dolor, adicción a nicotina, entre otras (Corradi y Bouzat, 2016b). Los estudios sobre plasticidad neuronal *in vitro* y sobre efectos cognitivos *in vivo* apoyan favorablemente la idea de que la potenciación de $\alpha 7$ podría resultar una forma efectiva de terapia contra la declinación cognitiva (Lendvai et al., 2013).

Tradicionalmente, las estrategias terapéuticas más comunes para corregir los déficits colinérgicos se han relacionado con el aumento de la síntesis de ACh, la estimulación de los receptores colinérgicos o la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, el incremento en la síntesis de ACh ha mostrado poca eficacia; la utilización de agonistas colinérgicos produce desensibilización de los receptores, llevando a tolerancia y por lo tanto pérdida de los efectos beneficiosos; y la inhibición de la acetilcolinesterasa produce mejoras de los síntomas de corta duración, que no impiden la progresión de la enfermedad (Maelicke y Albuquerque, 2000).

En lo que respecta a $\alpha 7$, el enfoque inicial para incrementar su actividad se centró en la búsqueda de agonistas parciales selectivos, que al tener menor eficacia que los agonistas completos ejercen un efecto sinérgico con el agonista endógeno, resultando en una mejora en la señalización por el receptor. Sin embargo, el tratamiento prolongado con agonistas exógenos termina alterando la secreción normal del endógeno, y además provoca desensibilización de los receptores, generando tolerancia y/o dependencia.

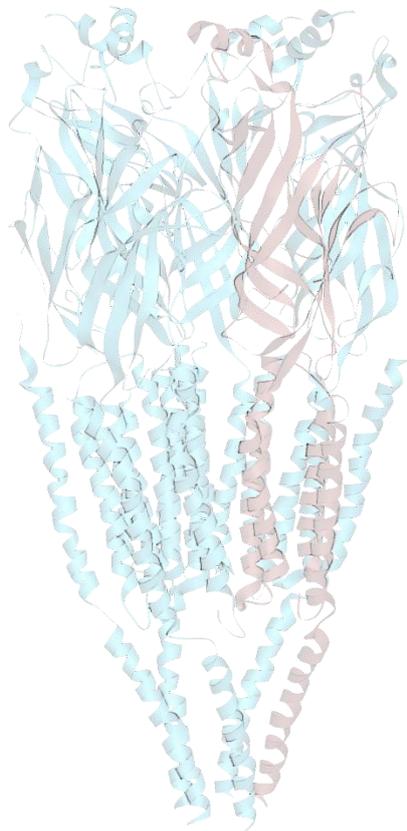
Una de las nuevas y prometedoras estrategias terapéuticas para mejorar la función del nAChR $\alpha 7$ es la utilización de PAM selectivos. Estos compuestos producen la potenciación de la respuesta del receptor a su agonista ortostérico, pero tienen muy escaso o nulo efecto por sí solos (N. Andersen et al., 2016; Bouzat et al., 2018; Corradi y Bouzat, 2016b; R. S. Hurst et al., 2005). Como primera ventaja, los PAM mantienen las características temporales y espaciales de la activación endógena debido a que no son

capaces de activar por si solos a los receptores, sino que aumentan la potencia o eficacia de la activación por agonistas endógenos liberados naturalmente según las necesidades. En segundo lugar, entre los distintos nAChR, los sitios alostéricos son mucho menos conservados evolutivamente que los sitios ortostéricos, lo que permite mayor selectividad, a la hora de emplear compuestos sintéticos, que la que ofrecen los sitios ortostéricos. Por otra parte, los PAM permiten mayor diversidad en la estructura y efectos finales a causa de la existencia de distintos sitios alostéricos dentro de un mismo receptor. Por último, en muchos tratamientos con agonistas, la activación de $\alpha 7$ se ve disminuida a causa de la desensibilización, por lo que aquellos PAM que actúen sobre dicho proceso reducirían la tolerancia, haciendo más eficaces dichos tratamientos (Bouzat et al., 2018; Chatzidaki y Millar, 2015; Corradi y Bouzat, 2016b; Maelicke y Albuquerque, 2000; Uteshev, 2014).

El uso de agonistas y PAM de $\alpha 7$, no solo incrementa la actividad ionotrópica del receptor sino también la metabotrópica. Esto puede resultar beneficioso si la patología que se quiere tratar se relaciona con déficit de la función del receptor. Sin embargo, no debería dejar de considerarse que en muchas células no neuronales el aumento de la actividad metabotrópica de $\alpha 7$ puede promover el desarrollo de cáncer, ya que estimula la proliferación celular, la metástasis y la angiogénesis. También, es importante destacar que, si el receptor $\alpha 7$ se asocia al desarrollo de algún proceso cancerígeno específico, la utilización de antagonistas competitivos y/o NAM específicos del receptor podría ser de utilidad terapéutica (Grando, 2014; Zhao, 2016).

La presente tesis aborda el estudio de uno de los subtipos de receptores nicotínicos de ACh más abundantes en SN, el receptor $\alpha 7$. El enfoque está puesto en entender aspectos moleculares de la modulación de las funciones ionotrópica y metabotrópica del receptor. Los tres capítulos en los que se estructura esta tesis abordan modulaciones diferentes del receptor: (i) eventos intracelulares de fosforilación/desfosforilación (Capítulo I); (ii) fragmento peptídico de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 (Capítulo II); y (iii) cannabidiol (Capítulo III).

METODOLOGÍA



1. Cultivo celular

Se utilizaron células BOSC23, que son células epiteliales humanas embrionarias de riñón derivadas de las HEK293 (Pear et al., 1993a). Las células se cultivaron a 37 °C bajo una atmósfera controlada de 5 % de CO₂, en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y con los antibióticos penicilina y estreptomina.

2. Subunidades salvajes y mutantes

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizaron los ADN complementarios (ADNc) de: (i) la subunidad humana del nAChR $\alpha 7$ salvaje; (ii) las chaperonas humanas del nAChR $\alpha 7$, Ric-3 (*Resistant to Inhibitors of Cholinesterase 3*) y NACHO o TMEM35 (*Transmembrane Protein 35*); y (iii) la proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescence Protein*). Los distintos ADNc fueron subclonados en los vectores plasmídicos pRBG4 o pcDNA3.1. Las secuencias nucleotídicas fueron posteriormente verificadas por secuenciación.

Para la construcción de subunidades mutadas en uno o más sitios puntuales de la secuencia de aminoácidos de la proteína se diseñaron distintos oligonucleótidos, llamados cebadores o *primers*, con secuencias idénticas a la del ADNc salvaje salvo por los nucleótidos que codificaban los aminoácidos a mutar. Estos cebadores fueron utilizados con un kit comercial de mutagénesis dirigida (*QuikChange® Site-Directed Mutagenesis*) para generar las mutaciones en la secuencia nucleotídica de la subunidad salvaje subclonada en vectores, por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) con una polimerasa de alta fidelidad (*Pfu Ultra*). A continuación, el producto de la PCR, que contenía muchas copias del vector con la subunidad mutante, se sometió a una digestión con la enzima Dpn I que degrada solo el ADN del vector salvaje porque reconoce metilaciones en su secuencia provenientes de la amplificación bacteriana previa. Las secuencias finales se confirmaron mediante secuenciación.

Para esta tesis se construyeron las siguientes subunidades mutadas a partir del nAChR $\alpha 7$ salvaje: (i) $\alpha 7$ -Y386F; (ii) $\alpha 7$ -Y442F; (iii) $\alpha 7$ -Y386F/Y442F; (iv) $\alpha 7$ -T331A; (v) $\alpha 7$ -S365A; (vi) $\alpha 7$ -S365D; y (vii) $\alpha 7$ -S368A. Además, en el capítulo III se utilizó una subunidad de $\alpha 7$, ya generada en el laboratorio, que cuenta con cinco mutaciones

puntuales ($\alpha 7$ -TSLMF). Por último, para un experimento del capítulo I, se utilizó el ADNc de la quinasa Src inactiva (Src-K297R).

3. Expresión heteróloga de receptores

La línea celular BOSC23 fue empleada como sistema de expresión heterólogo para los nAChR $\alpha 7$ salvaje y mutantes ya que posee una elevada eficiencia de transfección (Pear et al., 1993b). Para lograr la expresión transitoria de dichos receptores se utilizó el protocolo de transfección por precipitación con fosfato de calcio (Bouzat et al., 1994). Este consiste en la generación de un precipitado fino de complejos de fosfato de calcio con los ADNc mediante la mezcla de un buffer salino de HEPES con una solución concentrada de cloruro de calcio conteniendo los ADNc. Luego, dicho precipitado es agregado a las células en cultivo en cápsulas de Petri con un 40-60 % de confluencia. Finalmente, tras una incubación de las células por 8-18 horas a 37 °C y 5 % de CO₂, se finaliza la transfección con el cambio completo del medio de cultivo. Las células así transfectadas fueron utilizadas a las 48-72 horas para los estudios electrofisiológicos, análisis de proteínas por *western blot* o ensayos de movimiento de Ca²⁺ intracelular.

Para aumentar el nivel de expresión de los nAChR $\alpha 7$ salvaje y mutantes, los ADNc de las subunidades de dichos receptores fueron cotransfectados con los ADNc de las chaperonas Ric-3 y NACHO (Gu et al., 2016; Loring, 2022; M. E. Williams et al., 2005). Para cada cápsula de Petri de cultivo celular de 35 mm se utilizó una mezcla de ADNc total de 4-5 μ g en una proporción 1 : 2 : 0,5 de $\alpha 7$ salvaje o mutante : Ric-3 : NACHO.

Para los estudios electrofisiológicos, se incorporó en la transfección el ADNc de GFP en una proporción 1:10 con respecto al ADNc de $\alpha 7$ salvaje o mutante. Las células fluorescentes verdes, tras la exposición a luz ultravioleta, por expresión de GFP fueron seleccionadas para los estudios electrofisiológicos, ya que son las que tienen mayor probabilidad de haber incorporado también el ADNc del receptor de interés (Figura 1). Además, la proporción de células fluorescentes verdes con respecto al total de células observadas por contraste de fase permitió verificar la eficiencia de la transfección del día de trabajo.

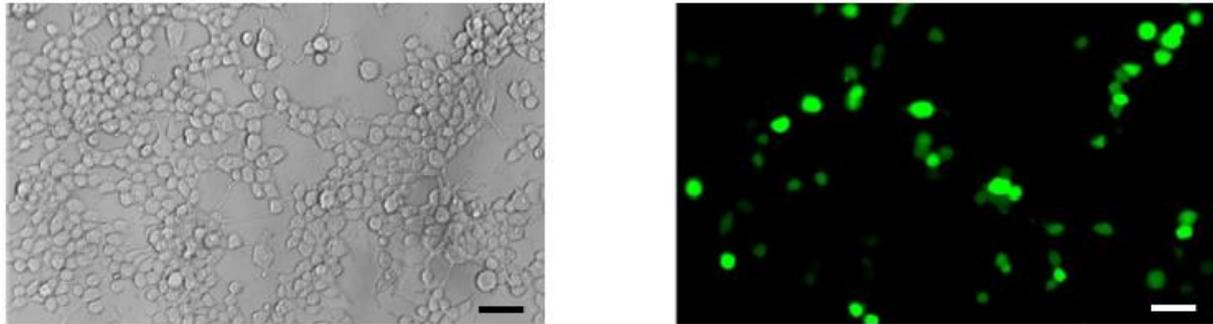


FIGURA 1. Células BOSC23 transfectadas con el ADNc de GFP.

Se muestran dos microfotografías de células BOSC23 transfectadas con el ADNc de GFP por el método de precipitación con fosfato de calcio. La microfotografía de la izquierda es de microscopía de campo claro, y la de la derecha corresponde al mismo campo con microscopía de fluorescencia. Las células fluorescentes verdes fueron elegidas para realizar los experimentos. La barra de escala corresponde a 50 μm .

4. Estudios electrofisiológicos: *patch-clamp*

4.1. Configuraciones de *patch-clamp*

La técnica de *voltage-clamp* es un método electrofisiológico utilizado para investigar las propiedades de los canales iónicos porque permite medir la corriente a través de la membrana celular manteniendo constante el potencial de membrana. La técnica de *patch-clamp* fue desarrollada por Erwin Neher y Bert Sakmann para detectar corrientes iónicas de canales unitarios presentes en una pequeña porción de membrana plasmática (*patch*) en configuración *voltage-clamp*. Este método electrofisiológico, no solo permite la detección de corrientes iónicas que pasan a través de un único canal (corrientes microscópicas o unitarias), sino que también permite medir la suma de las corrientes iónicas que pasan a través del total de los canales de la célula (corriente macroscópica). Para ello se utilizan diferentes configuraciones de la técnica de *patch-clamp*: (i) *cell-attached*, (ii) *inside-out*, y (iii) *outside-out* para el registro de corrientes unitarias; y (iv) *whole-cell* para el registro de corrientes macroscópicas (Hamill et al., 1981) (Figura 2).

El primer paso de la técnica para cualquiera de las cuatro configuraciones consiste en la obtención de un sello de alta resistencia entre un pequeño parche de membrana plasmática y una pipeta de vidrio que funciona como un microelectrodo. Si se quiere detectar corrientes unitarias del orden de los pA, el aislamiento del ruido eléctrico exterior es fundamental y por ello debe obtenerse un sello de alta resistencia eléctrica, del

orden de los $G\Omega$ ("gigasello"). Para lograrlo, la pipeta de vidrio se dirige hacia las células adheridas al fondo de una cápsula por medio de un manipulador externo muy sensible. Luego de acercarse la punta de la pipeta a la célula, se la toca muy suavemente y se aplica una pequeña succión negativa a través de la pipeta, formándose así el sello de alta resistencia. Este sello es el componente de mayor resistencia dentro del circuito de resistencias en serie, de manera que, al fijar un voltaje constante a este pequeño parche de membrana, la corriente que se detecta gracias al amplificador es la corriente que fluye a través de los canales presentes en esa porción de membrana. Esta primera configuración descrita, denominada *cell-attached*, sirve para detectar corrientes unitarias conservando intacto el ambiente intracelular. Los agonistas, antagonistas y moduladores que se quieran probar se colocan en la solución del interior de la pipeta. La desventaja de esta configuración es la imposibilidad de cambiar las composiciones del interior de la pipeta (solución que baña la cara extracelular del parche de membrana) y del interior celular.

A partir de la configuración *cell-attached* es posible obtener las demás configuraciones de *patch-clamp*. Si se retira la pipeta con el parche de membrana, manteniendo el sello de alta resistencia formado previamente, se obtiene la configuración *inside-out*. En esta, la cara intracelular del parche de membrana queda expuesta a la solución que baña a las células, por lo que utilizando un sistema de perfusión es posible cambiar su composición (agregar drogas, por ejemplo) mientras se registran las corrientes unitarias con el agonista presente en la solución de pipeta. La desventaja de esta configuración es que se pierden factores citosólicos y contactos con proteínas intracelulares que pueden alterar el comportamiento de los canales que se están registrando.

Si partiendo de *cell-attached* se aplica un pulso de succión fuerte puede lograrse la ruptura del parche adherido a la pipeta sin comprometer la integridad del gigasello entre la pared de la pipeta y la membrana plasmática, permitiendo el acceso al interior celular. Esta configuración, denominada *whole-cell*, permite registrar corrientes macroscópicas provenientes del total de los canales iónicos de la célula. Con un sistema de perfusión se puede alterar de manera sencilla la solución extracelular que baña a las células, permitiendo cambiar agonistas y/o moduladores. Las desventajas son la imposibilidad de cambiar la solución del interior de la pipeta y, con el tiempo, el lavado de factores citosólicos como consecuencia de la dilución en el líquido de la pipeta.

Por último, a partir de *whole-cell*, es posible obtener la configuración *outside-out*. Para ello se retira suavemente la pipeta permitiendo la separación y el resellado de un fragmento de membrana que contiene receptores, formando así una vesícula en donde la porción extracelular de la membrana queda expuesta a la solución que baña a las células, y la porción intracelular, a la solución de pipeta. De este modo se pueden registrar corrientes a nivel de canal único, con la posibilidad de modificar fácilmente la composición del medio extracelular con un sistema de perfusión, aunque nuevamente tiene la desventaja de la pérdida de factores citosólicos.

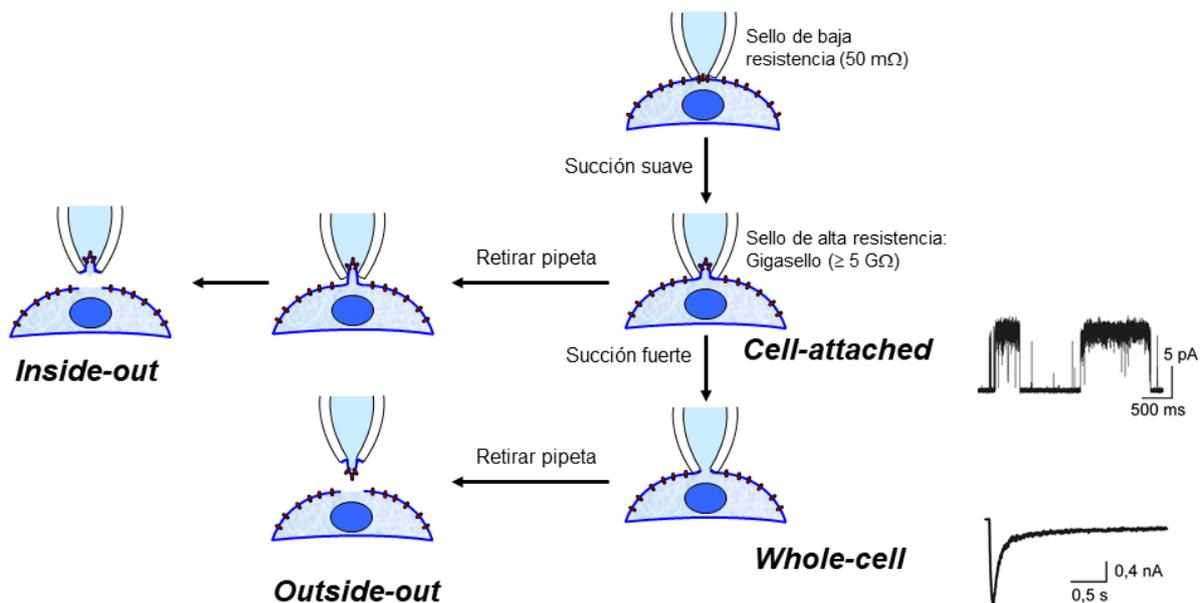


FIGURA 2. Configuraciones de patch-clamp.

Esquema de las diferentes configuraciones de *patch-clamp* indicando la secuencia de pasos para su obtención. Para las configuraciones *cell-attached* y *whole-cell* se muestran registros representativos.

4.2. Microelectrodos

Las pipetas de *patch-clamp* (microelectrodos) se prepararon a partir de capilares de vidrio de borosilicato (*Kimble Chase*) con un *puller* (*Sutter Instruments*, modelo P-97) (Figura 3). Las terminaciones de las pipetas fueron pulidas por calor para suavizar la punta y favorecer la formación posterior de los sellos. El diámetro de las puntas debe ser menor a 1 μm para que las pipetas tengan una resistencia entre 5-7 M Ω . Para los experimentos en configuración *cell-attached* e *inside-out* las pipetas fueron revestidas con un polímero aislante, llamado *Sylgard* (*Down Corning*), con el objetivo de reducir la

capacitancia de la pipeta de vidrio dentro de la solución y de este modo disminuir el ruido del sello.



FIGURA 3. Puller.

Se muestra el *puller* utilizado para preparar las pipetas de *patch-clamp* (microelectrodos).

4.3. Equipamiento

Las células se visualizaron mediante un microscopio invertido (*Nikon Eclipse TS100* o *Zeiss Axiovert S100*) equipado con un sistema de epifluorescencia (lámpara de luz ultravioleta incorporada o sistema LED). El acercamiento de la pipeta a la célula se realizó mediante micromanipuladores *PatchMan* (Eppendorf) o *PatchStar* (Scientifica). Las corrientes iónicas fueron detectadas y amplificadas con un amplificador Axopatch 200B o 200A (*Molecular Devices*), y digitalizadas a través de una interfaz PCI-6111E (*National Instruments*). Estos equipos se ubicaron sobre mesas antivibratorias recubiertas por cajas de Faraday (Figura 4).

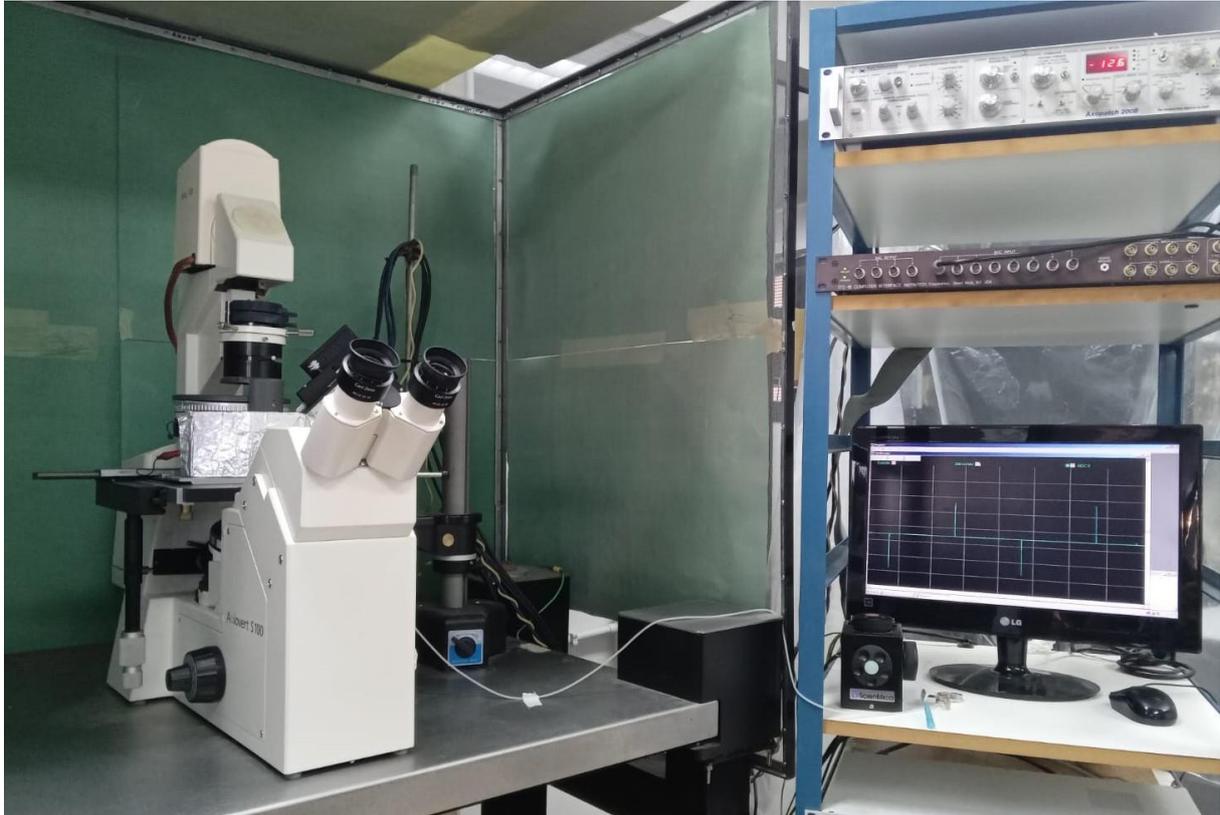


FIGURA 4. Equipo de patch-clamp.

Se muestra el equipo de patch-clamp utilizado para los estudios electrofisiológicos.

4.4. Registros de canal único: configuraciones *cell-attached* e *inside-out*

4.4.1. Soluciones

Para los registros de canal único en la configuración *cell-attached* se utilizó la misma solución en el baño de las células y en el interior de la pipeta. Como esta solución está en contacto con la porción extracelular de la membrana plasmática, tanto dentro como fuera de la pipeta, se la llama solución extracelular (ECS, *ExtraCellular Solution*). La composición de la ECS se asemeja a la del interior celular: KCl 142 mM, NaCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,7 mM y HEPES 10 mM, con un pH = 7,4. Para los registros de canal único en la configuración *inside-out*, también se utilizó la misma solución en el baño de las células y en el interior de la pipeta, aunque aquí no se la llama ECS ya que solo funciona como solución extracelular dentro de la pipeta, debido a que la solución que baña las células está en contacto con la cara intracelular del parche de membrana adherido a la pipeta. La composición es la detallada para la ECS

Para la mayoría de los experimentos, los agonistas solos o combinados con moduladores fueron disueltos en la solución de pipeta a partir de las soluciones stock, posibilitando registros de canal único en presencia continua de las drogas de interés. En algunos experimentos particulares, que serán explicados con más detalle a lo largo de los capítulos, la droga de interés fue agregada a la solución que baña las células durante el transcurso del registro para poner en evidencia los cambios en las propiedades de los canales por el agregado de dicha droga.

4.4.2. Obtención de los registros y análisis de las corrientes unitarias

Los registros fueron realizados a temperatura ambiente ($\sim 20-22$ °C) y a un potencial de membrana de -70 mV. Las corrientes unitarias fueron detectadas, amplificadas y filtradas a 10 kHz con el amplificador, digitalizadas a $200-100$ kHz por medio de la interfaz (intervalos de $5-10$ μ s respectivamente) y adquiridas en una computadora con el programa Acquire (*Bruyton Corporation*).

El análisis de las corrientes unitarias fue llevado a cabo con el programa TAC X4.2.0 (*Bruyton Corporation*). En general, se aplicó a los registros un filtro digital Gaussiano de 9 kHz, salvo aquellos obtenidos en presencia de PNU-120596, donde se utilizó un filtro de 3 kHz. Utilizando este programa, las corrientes microscópicas fueron idealizadas en eventos individuales de apertura y cierre, los cuales se detectaron por el criterio del umbral de amplitud media. Tras la idealización de los registros se construyeron diferentes histogramas que fueron ajustados con funciones matemáticas por medio del programa TACFit X4.2.0 (*Bruyton Corporation*) para el análisis de amplitud y el análisis cinético de los canales iónicos.

Para el análisis de amplitud todos los eventos fueron detectados sin discriminar su amplitud y posteriormente se construyeron los histogramas para este parámetro. Estos fueron ajustados por el método de la máxima probabilidad mediante una función gaussiana con uno o más componentes sumados, cada uno con su amplitud promedio, desviación estándar y área relativa.

Para llevar a cabo el análisis cinético, en primer lugar, se construyeron los histogramas de duración de estado abierto y cerrado para todos los eventos detectados en el registro, y posteriormente los histogramas de duración de los episodios de activación sostenidos (*bursts* y/o *clusters*). Los histogramas de duración se graficaron mostrando en las abscisas el tiempo de duración de los eventos en escala logarítmica, y

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

En el histograma de estado abierto se determinaron las duraciones de las aperturas del receptor, reportándose siempre el componente de mayor duración (τ_{open}). El histograma de estado cerrado se construyó por su utilidad en la delimitación posterior de los episodios de activación sostenidos (*bursts* y/o *clusters*).

Un *burst* se define como una serie de eventos de aperturas sucesivas, generados por una única molécula de receptor, separadas entre sí por períodos de cierre breves, inferiores a cierto tiempo crítico ($\tau_{crítico}$). Se sugiere que el agonista permanece unido al receptor durante la duración del *burst*. Para algunos receptores y/o en presencia de ciertos moduladores se observan *clusters*, que son episodios de activación sostenidos de larga duración constituidos por dos o más *bursts* agrupados, también generados por una única molécula de receptor. En general, los *bursts* y/o *clusters* están separados entre sí por largos prolongados sin actividad que se corresponderían con estados desensibilizados.

En un sistema heterólogo, el grado de expresión variable de los receptores afecta las constantes de tiempo de estado cerrado de mayor duración, ya que pueden ser mayores o menores dependiendo de si el número de canales en el parche de membrana es bajo o alto respectivamente. Sin embargo, no se ve afectada la constante de tiempo del estado cerrado de menor duración dentro del *burst*, lo que permite determinar el $\tau_{crítico}$, que se define como el tiempo de intersección entre el componente más prolongado dentro del *burst* y el componente siguiente fuera del *burst*. Utilizando el $\tau_{crítico}$ se construyeron los histogramas de duración de *bursts*, donde los mismos quedaron definidos como una serie de aperturas sucesivas separadas entre sí por períodos de cierre con duraciones inferiores al $\tau_{crítico}$. En estos histogramas se determinó la duración de los episodios de activación sostenidos o *bursts* como la constante de tiempo del componente de mayor duración (τ_{burst}).

De la misma manera, para los casos donde la activación del receptor se da en *clusters*, se determinó el $\tau_{crítico}$ para diferenciar los cierres entre *bursts* dentro de un mismo *cluster*, de aquellos cierres prolongados fuera del *cluster*. Con el uso de este $\tau_{crítico}$ se construyeron los histogramas de duración de *clusters* y se determinó su constante de tiempo a partir del componente con mayor duración del histograma ($\tau_{cluster}$).

4.5. Registros de corrientes macroscópicas: configuración *whole-cell*

4.5.1. Soluciones

Para los registros de corrientes macroscópicas en la configuración *whole-cell* se utilizaron dos soluciones diferentes. La solución de pipeta corresponde a la solución intracelular (ICS, *IntraCellular Solution*), y la del baño a la extracelular (ECS). La composición de la ICS fue de: KCl 134 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM, con un pH = 7,3; mientras que la de la ECS fue de: NaCl 150 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM, con un pH = 7,3.

La ACh, utilizada como agonista para evocar las corrientes de los receptores $\alpha 7$ salvaje o $\alpha 7$ -Y386F/Y442F, fue disuelta en ECS a partir de la solución stock, para luego ser aplicada sobre las células mediante un sistema de perfusión.

4.5.2. Obtención de los registros y análisis de las corrientes macroscópicas

Los registros fueron realizados a temperatura ambiente (~ 20 - 22 °C) y a un potencial de membrana de -50 mV. Las corrientes macroscópicas fueron filtradas a 5 kHz por el amplificador, digitalizadas a 20 kHz por medio de la interfaz y adquiridas en una computadora con el programa WinWCP (*Strathclyde Electrophysiology Software*).

Para la aplicación de las soluciones sobre las células se utilizó un sistema de perfusión rápido. Este se compone de reservorios de soluciones suspendidos en altura para favorecer por gravedad el flujo a través de mangueras hasta alcanzar las válvulas controladas por el programa de adquisición de las corrientes. Luego, las soluciones continúan su circulación por tubos muy finos cuyos extremos se sitúan ligeramente por encima del plano las células en la cápsula de cultivo. Mediante el protocolo de *open pipette*, se calculó el tiempo de intercambio de soluciones. Este consistió en colocar el extremo abierto de una pipeta cargada con ICS en la proximidad del flujo de perfusión y modificar sucesivamente las soluciones perfundidas (ECS y su dilución al $\frac{1}{2}$), provocando un cambio en el potencial de unión líquida. El tiempo de intercambio de soluciones es el requerido para producir entre el 20-80 % del cambio total, y varió en un rango entre 0,1-1,0 ms (Corradi et al., 2009).

El análisis de las corrientes macroscópicas fue realizado con el programa ClampFit (*Molecular Devices*). Para cada condición se registraron 3-5 trazos en la misma célula, los cuales fueron alineados en el pico máximo y promediados para obtener la corriente

macroscópica control o experimental final. Se determinaron las constantes de decaimiento al ajustar las corrientes macroscópicas promedio con una función exponencial simple, de acuerdo a la siguiente ecuación: $I(t) = I[\exp(-t/\tau_d)] + I_\infty$; donde t es el tiempo, I es el pico máximo de corriente, I_∞ es el valor de la corriente en el estado estacionario, y τ_d es la constante de decaimiento.

Para estudiar la velocidad de recuperación de los receptores $\alpha 7$ salvaje o $\alpha 7$ -Y386F/Y442F desde el estado desensibilizado se utilizó un protocolo de doble pulso pareado (Bouzat et al., 2008). Luego de lograr la configuración *whole-cell*, se aplica un pulso desensibilizante de ACh 1 mM por 300 ms (pulso control), el agonista es removido, y se lava con ECS durante intervalos de tiempo que van incrementándose gradualmente de a 100 ms (interpulso), para luego dar un segundo pulso de 300 ms de ACh 1 mM (pulso de testeo). El pulso control provoca una corriente macroscópica que es el resultado de la activación conjunta de todos los receptores presentes en la célula y, además, por su duración y la concentración elevada de ACh, dicho pulso lleva a todos los receptores hacia el estado desensibilizado. Durante el interpulso, de duración variable, las células están expuestas a la ECS libre de agonista y, por lo tanto, los receptores se van recuperando desde el estado desensibilizado hacia el cerrado en reposo. La velocidad a la que ocurre esta transición depende del receptor, del tiempo y de las condiciones experimentales. Finalmente, el pulso de testeo, de igual duración y concentración de ACh que el pulso control, evoca una respuesta macroscópica que es el resultado de la activación conjunta de todos los receptores que en ese momento están en estado de reposo en la célula. La relación entre el pico de amplitud de la segunda corriente y el pico de amplitud de la primera es una medida del porcentaje de receptores que se recuperaron de la desensibilización durante el interpulso. Se calcula la relación para cada tiempo de interpulso y se grafica en función dicho tiempo. La curva obtenida se ajusta con una función exponencial: $I_r(t) = a(1 - [\exp(-t/\tau_r)])$; donde t es el tiempo de interpulso, I_r es la fracción de corriente recuperada entre el primer y segundo pulso para cada tiempo, a es la máxima recuperación respecto al control, y τ_r es la constante de tiempo de recuperación del receptor.

5. Análisis de proteínas: *western blot*

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos (4×10^5 células/pocillo) donde fueron transfectadas con el ADNc de las subunidades de $\alpha 7$ salvaje o $\alpha 7$ -Y386F/Y442F, y cultivadas durante 48 horas más en DMEM con suero fetal bovino al 10 %. A continuación, fueron privadas del suero por 24 horas para dar comienzo a los ensayos. En el día experimental, las células fueron sometidas o no a un pretratamiento de 30 minutos con el inhibidor de quinasas. Para la activación de los receptores, se aplicó un pulso de PNU-282987 $10 \mu\text{M}$. A continuación, las células se lavaron rápidamente con un buffer fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) frío y se lisaron en buffer RIPA (Tris 10 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; ortovanadato de sodio 2 mM; SDS al 0,1 %; Igepal al 1 % y desoxicolato de sodio al 1 %) en presencia de inhibidores de proteasa (fluoruro de fenilmetilsulfonilo y cóctel de inhibidores de proteasa). Se separaron cantidades iguales de proteínas (20 μg) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Amersham Biosciences*). Los blots se bloquearon en leche descremada al 5 % y Tween-20 al 0,3 % en solución salina tamponada con Tris y se incubaron con los anticuerpos primarios en leche descremada al 2,5 % y solución salina Tris tamponada Tween-20 al 0,15 %. La quinasa ERK 1/2 fosforilada (p-ERK1/2) se detectó usando el anticuerpo monoclonal anti-p-ERK 1/2 en dilución 1 : 100 (sc-7383, *Santa Cruz Biotechnology*). Los inmunocomplejos se revelaron por quimioluminiscencia usando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (*Amersham Biosciences*), en una dilución 1 : 2000 en la misma solución que los anticuerpos primarios. Se utilizó la marcación de ERK 1/2 (sc-94, *Santa Cruz Biotechnology*) para la normalización de la carga de proteínas. La detección de quimioluminiscencia se realizó utilizando una solución de detección que consiste en: luminol 1,25 mM, ácido p-cumárico 0,2 mM, peróxido de hidrógeno al 0,06 %v/v, Tris-HCl 100 mM, pH 8,8; y las inmunotransferencias se expusieron a películas autorradiográficas.

6. Movimientos de Ca^{2+} intracelular

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en respuesta a la estimulación de los nAChR $\alpha 7$ luego de diferentes tratamientos fueron monitoreados en células cargadas con la sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} Fluo-3/AM.

Las células BOSC23 fueron transfectadas con el ADNc de la subunidad $\alpha 7$, luego de 24 horas fueron levantadas y pasadas a placas de cultivo con fondo de vidrio recubierto con poli-L-ornitina para favorecer el pegado de las células al vidrio. A las 24 horas de este traspaso se realizaron los ensayos. En el día experimental, las células fueron tratadas por 2 horas y mantenidas con atropina 1 μM (antagonista de los mAChR). Luego fueron cargadas con Fluo-3/AM 3 μM en buffer Fura (NaCl 138 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 1 mM, glucosa 5 mM, HEPES 10 mM, 1,5 CaCl_2 mM, albúmina sérica bovina 0,1 %, pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se lavaron con PBS y se incubaron con probenecid 1 mM en buffer Fura durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para permitir la desesterificación intracelular de la sonda.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se midió utilizando un microscopio de barrido láser confocal de fluorescencia (LSM 900 Zeiss) con un objetivo de 10X y un ocular de 10X. Las células cargadas con Fluo-3/AM se excitaron a 506 nm y la emisión de fluorescencia a 526 nm se registró utilizando el programa Zen 3.0 Blue (Zeiss). Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas a intervalos de 0,633 segundos durante 3 minutos desde el pulso de activación de los receptores $\alpha 7$ (ACh 500 μM y PNU-120596 3 μM). El tratamiento con las diferentes drogas y condiciones experimentales se llevó a cabo antes de dicho pulso.

El análisis de la fluorescencia se realizó mediante el programa Zen lite (Zeiss). La fluorescencia basal (F_0) se determinó inmediatamente antes del pulso de activación de $\alpha 7$. Las mediciones se expresaron en relación a este valor de F_0 (F/F_0) para cada condición. Todas las condiciones se realizaron en ensayos paralelos, y el experimento completo se repitió con diferentes lotes de células y transfecciones (N). Para la cuantificación, para cada ensayo individual, se determinaron los valores de F_0 (justo antes del pulso) y F_{45} (45 segundos después del pulso) para un total de 10 a 25 células en el mismo campo, calculándose el valor medio de la relación F_{45}/F_0 (n).

7. Ensayos electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus laevis*

En el capítulo II se presentan algunos resultados obtenidos en ensayos electrofisiológicos de *voltage-clamp* de dos electrodos sobre ovocitos de *X. laevis* expresando de forma heteróloga el nAChR $\alpha 7$ humano. Estos ensayos fueron realizados por la Dra. Isabel Bermúdez, del laboratorio de Farmacología Molecular de la Universidad de Oxford Brookes, Oxford, Reino Unido, en el marco de un trabajo en colaboración. A continuación, se detalla de forma resumida la metodología aplicada.

7.1. Expresión de $\alpha 7$ en ovocitos de *X. laevis*

Los ejemplares hembra adultos de la rana africana *X. laevis* fueron hospedados en tanques color negro con 15 L de agua por animal a 18 °C, mantenidos bajo ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y alimentados dos veces al día. El cuidado y los procedimientos fueron acordes a las regulaciones del Reino Unido y aprobados por el Comité de Uso Animal de la Universidad de Oxford Brookes. Los ovocitos de *X. laevis* en etapa V y VI se prepararon como se describe en (Minguez-Viñas et al., 2021), y luego se inyectaron con 2-6 ng del ADNc de la subunidad $\alpha 7$ humana en el núcleo en un volumen de 23,0 nL, utilizando un Nanoject Automatic Oocyte Injector (*Drummond*). Para favorecer la expresión de $\alpha 7$, su ADNc se coinyectó con el ADNc de la chaperona NACHO en una proporción de 1 : 0,01 de $\alpha 7$: NACHO (Gu et al., 2016; Nielsen et al., 2018). Los ovocitos inyectados se incubaron hasta su uso a 18 °C en una solución OR2 que contenía: NaCl 82 mM; KCl 2 mM; MgCl₂ 2 mM; HEPES 5 mM; pH 7,5; suplementado con estreptomicina 0,1 mg/mL, penicilina 1000 U/mL y amikacina 100 μ g/mL. Los ovocitos se utilizaron para registros electrofisiológicos uno o dos días después de la inyección (Minguez-Viñas et al., 2021; Nielsen et al., 2018).

7.2. Registros electrofisiológicos en ovocitos de *X. laevis*

Los registros se realizaron a 18 °C y a un potencial de membrana de -60 mV. Las corrientes se registraron utilizando una plataforma automatizada equipada con una configuración estándar de *voltage-clamp* de dos electrodos (HiClamp; Multi Channel Systems, *Reutlingen*). Este sistema difiere de la electrofisiología estándar y de otras plataformas automatizadas porque, en lugar de aplicar el compuesto en la perfusión, el ovocito se traslada a un pocillo desde una placa de microtitulación de 96 pocillos que contiene 230 μ l de la solución deseada (Minguez-Viñas et al., 2021).

La capacidad del fragmento Y674-R685 para evocar corrientes en ovocitos de *X. laevis* que expresan $\alpha 7$ se examinó en un rango de concentraciones (1 pM-10 μ M) en paralelo con respuestas evocadas por ACh 100 μ M (CE₅₀) como control en las mismas células. Los compuestos se aplicaron durante 20 segundos y el período de lavado fue de 300 segundos. Para obtener datos concentración-respuesta para los efectos inhibidores de Y674-R685 en $\alpha 7$, se coaplicó el fragmento proteico a diferentes concentraciones (0,1 nM a 30 μ M) junto a ACh 100 μ M (CE₅₀). El rango de concentración fue similar al utilizado

para determinar los efectos de los péptidos similares a neurotoxinas de la glicoproteína del virus de la rabia en los nAChR (Hueffer et al., 2017). Los picos de las corrientes obtenidas de esta manera se normalizaron con el pico de las respuestas provocadas por la ACh sola. Los efectos del fragmento sobre la curva de concentración-respuesta de ACh se evaluaron determinando la curva de concentración-respuesta de ACh en ausencia y presencia de Y674-R685 1 μ M. El pico de las respuestas a ACh se normalizó a las respuestas provocadas por ACh 1 mM. Para ambos conjuntos de estudios, los datos normalizados se ajustaron con la ecuación de Hill utilizando el programa GraphPad versión 5 (Minguez-Viñas et al., 2021). Los datos se expresaron como el promedio \pm SEM de 5-6 ovocitos obtenidos de al menos tres lotes diferentes de ovocitos (N). Los datos se filtraron a 10 Hz, se capturaron a 100 Hz utilizando un programa de adquisición de datos patentado que se ejecuta en Matlab (*Mathworks Inc.*).

8. Drogas utilizadas

A lo largo de los tres capítulos de esta tesis se emplearon distintos agonista, antagonistas y moduladores del receptor $\alpha 7$. Como agonistas ortostéricos se utilizaron: (i) ACh (*Sigma-Aldrich*), agonista endógeno no selectivo; y (ii) PNU-282987 (*Santa Cruz Biotechnology*), agonista específico de $\alpha 7$. Como antagonistas se emplearon: (i) α -BTX (*ThermoFisher Scientific*); y (ii) MLA, antagonista competitivo específico de $\alpha 7$. Los PAM utilizados fueron el 5-HI (*Sigma-Aldrich*) y el PNU-120596 (*Tocris Biosciences*). Las soluciones stock de ACh y 5-HI fueron preparadas en ECS. Para los demás compuestos evaluados, la solución stock fue preparada en dimetilsulfóxido (DMSO).

En el capítulo I se utilizaron distintas drogas disueltas en DMSO para activar o inhibir quinasas y fosfatasas: (i) PP2 (4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)pirazolo[3,4-d]pirimidina); (ii) pervanadato; (iii) SU6656 ((3Z)-N,N-Dimetil-2-oxo-3-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-2-ilmetilideno)-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfonamida); (iv) 8-Br-cAMP (8-Bromo-adenosina-3',5'-monofosfato cíclico); (v) KT-5720 ((9R,10S,12S)-2,3,9,10,11,12-Hexahidro-10-hidroxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo [3,4-i][1,6]benzodiazocina -10-ácido carboxílico, éster hexílico); (vi) PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*); y (vii) Gö-6983 (3-[1-[3-(Dimetilamino)propil]-5-metoxi-1H-indol-3-il]-4-(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona).

En el capítulo II se utilizó un péptido sintético, denominado Y674-R685, correspondiente a un fragmento de 12 aminoácidos de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 (YQTQTNSPRRAR). El péptido fue sintetizado con un 90 % de pureza (*Designer Bioscience Ltd.*) y almacenado como stock 1 mM en agua a -20 °C.

Para los experimentos del capítulo III, la solución stock de cannabidiol en etanol fue amablemente proporcionada por los Dres. Fernando J. Sepúlveda y Gonzalo Yevenes (Universidad de Concepción, Chile). El cannabidiol se identificó como el único fitocannabinoide presente en la muestra mediante cromatografía de convergencia en comparación con estándares de referencia (*ProVerde Laboratories*). El delta-9-tetrahidrocannabinol en etanol (*Cerilliant Corporation*) fue amablemente proporcionado por la Dra. Susana Pasquaré (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, CONICET).

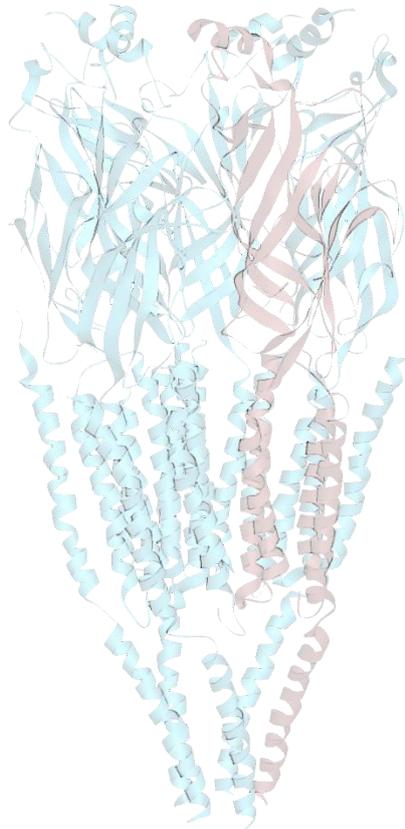
9. Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar (SD, *Standard Deviation*). Los conjuntos de datos se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y a la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. A continuación, la significancia estadística entre dos grupos fue evaluada por la prueba t-Student a dos colas y, para comparaciones entre más de dos grupos, se utilizó ANOVA de una vía, seguido por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los test estadísticos se realizaron con el programa SigmaPlot 12.0 (*Systat Software*). Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron para valores de $p < 0,05$ y los símbolos de asterisco (*) fueron empleados para indicar: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); y $p < 0,001$ (***)).

Con la letra “n” se denotó al número de experimentos independientes, el cual se corresponde con el número de células utilizadas en los ensayos experimentales. Con la letra “N” se denotó al número de repeticiones del experimento, el cual se corresponde con el número de transfecciones celulares realizadas.

CAPÍTULO I

MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN IONOTRÓPICA Y METABOTRÓPICA DE $\alpha 7$ POR EVENTOS DE FOSFORILACIÓN/DESFOSFORILACIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Modificaciones postraduccionales de proteínas

Las células vivas están constantemente expuestas a los estímulos de su entorno y, por lo tanto, deben adaptarse a condiciones que cambian rápidamente. Además de la expresión génica y el control de la traducción, que son procesos relativamente lentos, las modificaciones postraduccionales (MPT) de proteínas representan un nivel importante de regulación. Las MPT son eventos de procesamiento covalente que cambian las propiedades de una proteína luego de su biosíntesis, ya sea mediante la escisión proteolítica o bien por el agregado de un grupo modificador, a uno o más aminoácidos, y que conducen a la generación de una gran cantidad de proteoformas (Deribe et al., 2010; Duan y Walther, 2015; Olsen y Mann, 2013; Ramazi y Zahiri, 2021; Venne et al., 2014). Las MPT abarcan un espectro de reacciones, desde rápidas y reversibles, como por ejemplo la fosforilación (segundos), hasta otras más lentas e irreversibles, como ciertas formas de glicosilación (Venne et al., 2014). Hay más de 400 tipos diferentes de MPT que afectan muchos aspectos de las funciones de las proteínas. Tales modificaciones son mecanismos moleculares cruciales para regular diversas funciones celulares, y por lo tanto juegan un papel clave en numerosos procesos biológicos al afectar significativamente la estructura y la dinámica de las proteínas. Cualquier tipo de desregulación en la homeostasis de las MPT puede conducir potencialmente a un estado patológico, como por ejemplo cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y canalopatías (Curran y Mohler, 2015; Ramazi y Zahiri, 2021; H. Xu et al., 2018). La fosforilación, la acetilación y la ubiquitinación son las MPT más frecuentes, representando más del 90% de todas las reportadas en la bibliografía (K. Y. Huang et al., 2019).

2. Fosforilación de proteínas

La MPT más estudiada es la fosforilación de proteínas, reportada por primera vez en 1906 por Phoebus Levene con el descubrimiento del grupo fosfato en la proteína vitelina (Levene y Alsberg, 1906). Esta MPT consiste en la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a un aminoácido de la proteína sustrato mediante un proceso catalizado por enzimas quinasas. El proceso opuesto, la desfosforilación, es una reacción de hidrólisis catalizada por diferentes enzimas fosfatasas que consiste en la remoción o

eliminación del grupo fosfato de los residuos aminoacídicos de las fosfoproteínas. La fosforilación de proteínas en eucariotas ocurre principalmente en los hidroxiaminoácidos serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr), y también con menor frecuencia en histidinas y cisteínas, así como en lisinas y argininas (Cieśła et al., 2011).

En eucariotas, las quinasas se dividen en tres grupos principales: serina/treonina quinasas, tirosina quinasas, y quinasas de especificidad dual (Jin y Pawson, 2012). El sitio consenso de fosforilación está determinado por la estructura de la hendidura catalítica de la quinasa y las interacciones locales entre la hendidura de la quinasa y el sitio de fosforilación de la proteína (Talwar y Lynch, 2014). Las proteínas quinasas mejor caracterizadas incluyen la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA), la proteína quinasa C (PKC) y las proteínas tirosina quinasa (PTK), dentro de las que se incluyen las quinasas de la familia Src (SFK: *Src Family Kinase*). Las quinasas PKA y PKC fosforilan residuos de Ser y Thr, y las PTK fosforilan residuos de Tyr. Existen muchas otras quinasas, como por ejemplo la Ser/Thr quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) (Davis et al., 2001; Swope et al., 1992; Talwar y Lynch, 2014). La desfosforilación de fosfoserinas y fosfotreoninas de las proteínas ocurre principalmente por miembros de la familia de la fosfoproteína fosfatasa (PPP, *Phosphoprotein Phosphatase*), que incluye PP1, PP2A, PP2B y PP4-7, y de la familia de la proteína fosfatasa metalodependiente (PPM, *Metallo-Dependent Protein Phosphatase*), representada por PP2C; mientras que las fosfotirosinas son desfosforiladas por miembros de la familia de proteína tirosina fosfatasa (PTP, *Protein Tyrosine Phosphatase*) (Moorhead et al., 2009).

La fosforilación es un proceso reversible, que a menudo ocurre en el citosol o en el núcleo de las células (Duan y Walther, 2015). Esta MPT altera la función de una proteína en una de dos formas principales: (i) por un mecanismo alostérico (cambio conformacional de la proteína), o (ii) por generación de un sitio de unión a dominios de interacción de otras proteínas (Jin y Pawson, 2012). La fosforilación es un mecanismo regulador que juega un papel clave en las actividades de muchas enzimas, receptores, canales iónicos y demás proteínas en organismos procariotas y eucariotas, y de esta manera tiene un papel vital en procesos celulares importantes como la replicación, la transcripción, la respuesta al estrés ambiental, el movimiento celular, el metabolismo celular, la apoptosis, la diferenciación y el transporte de iones/moléculas (Forrest et al., 2006; Karve y Cheema, 2011; Ramazi y Zahiri, 2021). Se ha demostrado que las alteraciones en procesos de fosforilación/desfosforilación pueden conducir a diversas

patologías como cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, entre otras (Ramazi y Zahiri, 2021).

3. Fosforilación de pLGIC

Los canales iónicos juegan un papel esencial en todas las funciones celulares y su correcta expresión, función y regulación son fundamentales para la vida. Es bien sabido que la fosforilación influye en la función sináptica al modular directamente los pLGIC (Talwar y Lynch, 2014). Las señales extracelulares liberadas por la neurona presináptica (neurotransmisores y neuropéptidos) y las proteínas de la matriz extracelular regulan la fosforilación de los pLGIC con efectos funcionales variados que incluyen la regulación de la velocidad de desensibilización del receptor, el ensamblaje de subunidades y la agregación del receptor en la sinapsis. Por lo tanto, la fosforilación de los receptores de neurotransmisores representa un mecanismo importante en la regulación de su función y desempeña un papel fundamental en la plasticidad sináptica (Swope et al., 1992).

El ICD es la única región de los pLGIC que alberga sitios de fosforilación (Talwar y Lynch, 2014). La sección media entre MX y MA del gran *loop* M3-M4 es la región más divergente entre las diferentes subunidades, tanto en términos de longitud como de secuencia de aminoácidos (Stokes et al., 2015). Además, su estructura no se resuelve completamente para ninguna subunidad, probablemente por estar desordenada. Varios sitios de fosforilación altamente conservados y sitios de unión de anticuerpos se asignan a esta región desordenada, lo que sugiere que la misma está parcialmente expuesta a solventes y es capaz de interactuar con quinasas y fosfatasas, y posiblemente con otras proteínas citoplasmáticas (Ferns, 2021).

Se ha demostrado que los cuatro tipos de pLGIC son regulados por procesos de fosforilación. Por ejemplo, los procesos de desinhibición glicinérgica espinal desencadenados por el dolor inflamatorio crónico son causados por la fosforilación de los GlyR sinápticos $\alpha 1\beta$ y $\alpha 3\beta$ (San Martín et al., 2022). En los GABA_AR neuronales, la fosforilación del receptor por activación de la PKC modula tanto su función, como así también la potenciación alostérica por benzodiazepinas y barbitúricos (L. Gao y Greenfield, 2005). Diferentes isoenzimas de la PKC modulan la densidad superficial de los GABA_AR, la conductancia y la sensibilidad del receptor a los moduladores alostéricos positivos como el etanol, los neuroesteroides, las benzodiazepinas y los barbitúricos (Song y Messing, 2005). Por otro lado, las corrientes de los 5-HT₃R son potenciadas por la

PKC y por la caseína quinasa II (CKII, *Casein Kinase 2*) (S. Jones y Yakel, 2003; Sun et al., 2003). En cuanto a los nAChR, es abundante la evidencia que vincula la fosforilación con la modulación de los receptores. Esta información se resume en el siguiente apartado.

4. Fosforilación de los nAChR

Los nAChR tienen varios residuos Tyr, Ser y Thr en el ICD con el potencial de ser fosforilados. El sitio y tipo de fosforilación, como así también las consecuencias funcionales de dicho proceso difieren entre los subtipos de nAChR. A continuación, se mencionan los efectos de la fosforilación sobre los tres grandes grupos de nAChR: 1) nAChR de la NMJ, dentro de los cuales se incluye a los nAChR del órgano eléctrico de *Torpedo californica* (raya eléctrica) y *Electrophorus electricus* (anguila eléctrica); 2) nAChR neuronales en el SNP; y 3) nAChR neuronales en el SNC. Estos temas se han descrito con gran detalle en un trabajo de revisión realizado durante mi doctorado (Chrestia et al., 2023).

4.1. Fosforilación de los nAChR de la NMJ

Los primeros estudios que se realizaron sobre el efecto de la fosforilación en los pLGIC fueron utilizando los nAChR aislados de las membranas del órgano eléctrico de la raya *T. californica*. Posteriormente se usaron líneas celulares musculares, preparaciones de músculo y células expresando de forma heteróloga el receptor muscular. Los efectos de la fosforilación sobre los nAChR de la NMJ pueden clasificarse en dos categorías. Por un lado, los efectos en la formación y la estabilización de la NMJ, y por el otro, aquellos que impactan en la funcionalidad de los receptores en la NMJ ya madura.

4.1.1. Efecto de la fosforilación de los nAChR en la formación y estabilidad de la NMJ

La fosforilación de los nAChR musculares tiene un papel importante en la formación y maduración de la NMJ (Ferns, 2021; Rudell y Ferns, 2013). Durante este proceso los nAChR se agrupan en los sitios de contacto nervio-músculo de la membrana postsináptica, dispersándose aquellos que se encuentran en áreas no sinápticas (Li et al., 2018). La alta densidad de los nAChR en la NMJ es un determinante clave de la eficacia sináptica, y los defectos en su expresión o agrupación dan como resultado síndromes miasténicos (Engel, 2018).

Las terminales nerviosas secretan agrina que al interactuar con el receptor Tyr quinasa MuSK (*Muscle-Specific Kinase*) induce el agrupamiento de los nAChR por un proceso que involucra la fosforilación de la Tyr-390 en la subunidad β (Borges et al., 2008; Borges y Ferns, 2001; Ferns, 2021; Friese et al., 2007; Wiesner y Fuhrer, 2006). La agrina también induce la fosforilación de Tyr en la subunidad δ , aunque de manera independiente de la activación de MuSK, siendo responsables de este proceso las quinasas Abl (*Abelson tyrosine kinases*) y/o las SFK (Mittaud et al., 2004; Wiesner & Fuhrer, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que la fosforilación por la PKA de subunidades γ y δ sin ensamblar promueve la estabilidad de las mismas, lo que lleva a un aumento en la eficacia del ensamblaje de las demás subunidades, incrementando de esta manera la expresión en superficie de los nAChR maduros (Green et al., 1991; Levitan, 1994).

4.1.2. Efecto de la fosforilación de los nAChR en la función de los receptores en la NMJ madura

Los nAChR del órgano eléctrico de *T. californica* son fosforilados por la PKA, en Ser de las subunidades γ y δ (Huganir y Greengard, 1983; Yees y Huganir, 1987); por las PTK, en Tyr de las subunidades β , γ y δ (Huganir et al., 1984; Wagner et al., 1991); y por la PKC, en Ser de la subunidad δ (Huganir et al., 1986; Safran et al., 1987; Schroeder et al., 1991). Las consecuencias funcionales de la mayoría de estas fosforilaciones tienen relación con el fenómeno de desensibilización de los nAChR. Por acción de las PTK o de la PKA, la fosforilación de los nAChR de *T. californica* reconstituidos en liposomas aumenta su velocidad de desensibilización (Hopfield et al., 1988; Huganir et al., 1986). De la misma manera, la fosforilación por la PKA y la PKC de los nAChR en diversas líneas de células musculares de mamífero incrementa su tasa de desensibilización (Albuquerque et al., 1986; Eusebi et al., 1985; Middleton et al., 1986, 1988; Miles et al., 1987; Mulle et al., 1988; Ross et al., 1988; Smith et al., 1987). Además, la fosforilación por la PKA de los nAChR embrionarios de rana expresado en ovocitos de *X. laevis* aumenta la velocidad de recuperación del receptor desde el estado desensibilizado, al enlentecer la entrada del mismo en el estado desensibilizado profundo tras la exposición al agonista (Paradiso y Brehm, 1998; Quick y Lester, 2002).

4.2. Fosforilación de los nAChR de neuronas del SNP

En el SNP los nAChR median la transmisión sináptica rápida en los ganglios del SN autónomo entre la neurona preganglionar y la neurona postganglionar o la célula cromafín en la médula suprarrenal. La fosforilación de estos receptores afecta su expresión y localización, y también su funcionalidad.

Se conoce poco sobre los mecanismos de localización de los nAChR ganglionares en las regiones sinápticas. La agrina conservaría el mismo rol que en los receptores musculares (Martin et al., 2005), y la fosforilación de la subunidad $\alpha 3$ en una Ser del ICD sería importante para que los nAChR interactúen con proteínas de andamiaje postsináptico (Chrestia et al., 2023; Ferns, 2021; Rosenberg et al., 2008).

La fosforilación afecta también la funcionalidad de los nAChR ganglionares. En neuronas simpáticas embrionarias de pollo y en diferentes preparaciones con nAChR ganglionares la activación de la PKC aumenta la velocidad de desensibilización de los receptores nicotínicos (Clapham y Neher, 1984; Downing y Role, 1987; Role, 1984; Stallcup y Patrick, 1980). En cambio, en neuronas ganglionares de pollo, la activación de la PKA incrementa el grado de fosforilación de la subunidad $\alpha 3$ y también las corrientes macroscópicas de los nAChR, por un mecanismo que involucra un aumento en el número de receptores funcionales en membrana (Margiottat et al., 1987; Vijayaraghavan et al., 1990). Sin embargo, en un trabajo más reciente se demostró que la activación de la PKA mejora la función del nAChR ganglionar $\alpha 3\beta 4^*$ humano expresado en HEK293 al disminuir la velocidad de desensibilización y acelerar la velocidad de recuperación desde el estado desensibilizado (Di Angelantonio et al., 2011). Por último, en células cromafines que expresan el nAChR $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 5$ la inhibición de las SFK reduce las corrientes macroscópicas disparadas por nicotina, mientras que la inhibición de las PTP aumenta dichas corrientes (K. Wang et al., 2004; Wiesner y Fuhrer, 2006).

4.3. Fosforilación de los nAChR de neuronas del sistema SNC

En el SNC de mamíferos se expresan nueve subunidades de nAChR: $\alpha 2$ - $\alpha 7$ y $\beta 2$ - $\beta 4$. Estas subunidades forman varios tipos diferentes de nAChR, siendo los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2^*$ y los homoméricos $\alpha 7$ los más abundantes y mejor caracterizados. A continuación, se describe por separado el efecto de la fosforilación en la expresión y funcionalidad de ambos receptores.

4.3.1. Fosforilación de los nAChR $\alpha 4\beta 2^*$

En el ICD de la subunidad $\alpha 4$ existen muchas Ser, Thr y Tyr susceptibles de ser fosforiladas y que son sitios consenso conservados para varias quinasas (Chrestia et al., 2023; Viseshakul et al., 1998). Por su parte, la subunidad $\beta 2$ posee sitios que podrían ser fosforilados por la PKC y la CKII (Viseshakul et al., 1998) y, además, se conoce que dicha subunidad está fosforilada en estado basal en el receptor $\alpha 4\beta 2^*$ humano maduro presente en membrana (Pollock et al., 2009).

La fosforilación regula el número de nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ al afectar el ensamblaje, el transporte o la estabilización del receptor en la superficie celular por un mecanismo independiente de la síntesis proteica (Gopalakrishnan et al., 1997; Rothhut et al., 1996). La activación de la PKA y la PKC conduce a la fosforilación del nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ en diferentes etapas de su formación y maduración, con efectos diferenciales en su expresión y función (Chrestia et al., 2023; Pollock et al., 2009).

Los receptores $\alpha 4\beta 2^*$ juegan un papel crucial en la adicción a la nicotina, y su fosforilación está involucrada en esta importante función. Se sabe que estos receptores se desensibilizan y aumentan su número en membrana después de la exposición crónica a nicotina, ya que ésta actúa como chaperona farmacológica para mejorar la eficacia del ensamblaje y maduración de los nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ (Kuryatov et al., 2005). La eficacia de este proceso se ve incrementada de manera sinérgica por activadores de la PKC y la PKA (Biaggi-Labiosa et al., 2015; Gopalakrishnan et al., 1997). La regulación al alza inducida por nicotina implica un mecanismo dependiente de la PKC, y probablemente refleja la capacidad de la nicotina para activar a esta quinasa, lo que conduce a la fosforilación de las subunidades $\alpha 4$ inmaduras, promoviendo su ensamblaje y la formación de receptores $\alpha 4\beta 2^*$ maduros (Wecker et al., 2010).

La fosforilación también ejerce una modulación funcional de los nAChR $\alpha 4\beta 2^*$. La velocidad de recuperación del receptor desde el estado desensibilizado se ve incrementada por la fosforilación del mismo tras la activación de la PKC (Fenster et al., 1999). La explicación de este fenómeno sería que el receptor fosforilado tiene mayor velocidad de transición entre un estado desensibilizado profundo y uno intermedio más superficial (Quick y Lester, 2002). De la misma manera, en otro trabajo más reciente, se demostró que la inhibición de la PKC ϵ o las mutaciones de los sitios de fosforilación de dicha quinasa en el ICD de $\alpha 4$ disminuyen la velocidad de recuperación de los nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ desde el estado desensibilizado. Esto sugiere que la reducción de la fosforilación

prolonga el tiempo del receptor en el estado desensibilizado y por lo tanto disminuye la cantidad de receptores disponibles para la activación (Lee et al., 2015).

4.3.2 Fosforilación de los nAChR $\alpha 7$

El ICD de la subunidad $\alpha 7$ humana posee varias Ser y Thr, y dos Tyr (Y386 e Y442) que pueden ser fosforiladas por diversas quinasas (Charpantier et al. 2005a; Stokes, Treinin, y Papke 2015). Mediante la aplicación de diferentes técnicas bioquímicas y electroquímicas se demostró que la PKA, la PKC y la Src son capaces de fosforilar al nAChR $\alpha 7$ humano (Ahmad et al., 2019). Un análisis proteómico del interactoma de $\alpha 7$ de cerebro de ratón mostró interacciones del receptor con la PKA, la PKC y también con varias fosfatasas (Paulo et al., 2009).

En un trabajo *in vitro* con constructos del ICD de $\alpha 7$ de rata y pollo expresado en *Escherichia coli*, se demostró que la PKA fosforila al ICD en la Ser-342, que se corresponde con la Ser-365 humana (Moss et al., 1996). En células HEK293 transfectadas con el ADNc de la subunidad $\alpha 7$ de ratón, la fosforilación de esta Ser tras la activación de la PKA conduce a una disminución de las corrientes macroscópicas del nAChR. El efecto se explicó por una disminución del número de receptores en membrana sin verse modificadas las propiedades cinéticas ni la conductancia unitaria de los canales (Komal et al., 2015). En cortes de corteza prefrontal de ratón, la activación de los receptores de DA subtipos D1/D5 activa la PKA y produce una disminución de las respuestas macroscópicas de $\alpha 7$, demostrando que la DA ejerce un efecto negativo sobre la neurotransmisión nicotínica en las interneuronas corticales prefrontales, lo que puede ser un mecanismo que contribuye a la modulación de comportamientos cognitivos, como la atención o la memoria de trabajo (Komal et al., 2015).

En cuanto a la regulación de la expresión y función de los nAChR $\alpha 7$ por parte de la PKC hay varios estudios en diferentes sistemas celulares que demuestran un aumento en las corrientes mediadas por el receptor después de la exposición a diferentes ligandos que activan la vía de la PKC, como el ácido araquidónico, el nefiracetam (fármaco para tratar la demencia), el ácido esteárico y la indometacina (Kanno et al., 2012; Nishizaki et al., 1999, 2000; Ohta et al., 2003). En ninguno de estos trabajos se demostró la fosforilación de los nAChR, ni se exploró el mecanismo que subyace a la potenciación. Por otro lado, en una familia de Japón se encontró un polimorfismo de un solo nucleótido que genera la sustitución G423S en el ICD de $\alpha 7$ e introduce un sitio de fosforilación para la PKC. Este

receptor mutante expresado de forma heteróloga en ovocitos de *X. laevis* genera corrientes tras la activación con ACh. Luego del tratamiento con ésteres de forbol para activar a la PKC, dichas corrientes se ven reducidas en amplitud por un proceso que involucra un aumento en la velocidad de desensibilización. Esto no ocurre con el receptor salvaje, lo que demuestra que la fosforilación por la PKC promueve la desensibilización del receptor $\alpha 7$ -G423S y proporciona la primera evidencia de que una variante en el gen CHRNA7 humano, posiblemente asociado a la fosforilación, altera la función del receptor (Tsuneki et al., 2007).

Por último, hay varios trabajos que estudiaron de qué manera la fosforilación de Tyr afecta la expresión y función de los nAChR $\alpha 7$. En ovocitos de *X. laevis* expresando el receptor humano o de rata, en células de neuroblastoma SH-SY5Y, y en interneuronas del hipocampo de rata, la inhibición de las PTK o el aumento en la desfosforilación de Tyr lleva a un incremento en la amplitud de las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ disparadas por ACh. En cambio, la inhibición de las PTP o el aumento en la fosforilación de Tyr lleva a una disminución de esas respuestas (Charpantier et al., 2005; Cho et al., 2005). Además, $\alpha 7$ interactúa y es fosforilado por las SFK, y la inhibición de dichas quinasas aumenta la actividad del receptor (Charpantier et al., 2005). El mecanismo que subyace a estos efectos es una cuestión controvertida. Existen evidencias que demuestran que la desfosforilación incrementa el número de receptores en membrana al favorecer mecanismos de andamiaje y transporte de los mismos, sin modificarse las propiedades funcionales de los canales, ni su estado de fosforilación (Chang y Fischbach, 2006; Cho et al., 2005). Pero, por otro lado, también hay trabajos que demuestran que los efectos observados en las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ se deben a la modulación directa de la actividad del canal por fosforilación, sin que haya modificaciones en el número de receptores en membrana (Charpantier et al., 2005; Mielke y Mealing, 2009). En un estudio realizado en neuronas neocorticales de ratón se demostró que la activación del receptor de linfocitos T disminuye las corrientes de $\alpha 7$ debido a la fosforilación de la Tyr-442 del ICD. Esta disminución provocada por la fosforilación se explica por una combinación de una caída en el número de receptores $\alpha 7$ en membrana, sin alterar el número de receptores en toda la célula, junto con una disminución de la conductancia unitaria de los canales (Komal et al., 2014).

OBJETIVOS

Los estudios comentados previamente muestran que inequívocamente existe modulación de las corrientes de $\alpha 7$ a nivel macroscópico por modificación en el estado de fosforilación/desfosforilación, pero las interpretaciones y conclusiones son discrepantes, sobre todo en lo que respecta a la fosforilación de Tyr. Además, las corrientes macroscópicas, en las que se basan la mayoría de estos trabajos, no brindan información sobre los mecanismos moleculares subyacentes a esta modulación, y por ello siguen siendo en gran parte desconocidos. Esto se debe a que las amplitudes de dichas corrientes dependen del número de canales en toda la célula, y de la conductancia y probabilidad de apertura de cada canal individual. Los registros electrofisiológicos a nivel de canal único permiten revelar con buena resolución estas propiedades funcionales microscópicas.

Por otro lado, como se comentó en la introducción de esta tesis, $\alpha 7$ tiene, además de la actividad ionotrópica canónica, un rol metabotrópico al disparar vías de señalización intracelular tras su activación. El hecho de que la activación de quinasas conduzca a la fosforilación de $\alpha 7$ sugiere que el receptor podría estar asociado físicamente con componentes de estas vías, y que la fosforilación del receptor puede influir en la transducción de señales.

Por lo tanto, el objetivo general de este primer capítulo de la tesis es descifrar las bases moleculares de la modulación de la actividad ionotrópica y metabotrópica del receptor $\alpha 7$ humano por eventos de fosforilación/desfosforilación. Para ello se utilizarán técnicas electrofisiológicas, sobre todo a nivel de corrientes unitarias, que permiten estudiar las funciones ionotrópicas del receptor, en combinación con *western blot* para el estudio de las vías metabotrópicas. Como estrategia para cambiar el estado de fosforilación se utilizarán activadores e inhibidores de diferentes quinasas y fosfatasas, como así también diferentes mutantes de $\alpha 7$ que carecen de sitios puntuales de fosforilación.

Los objetivos específicos son:

- Explorar el efecto de la inhibición de las quinasas de la familia de Src sobre la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias.
- Dilucidar de qué manera se ven afectadas las corrientes microscópicas de $\alpha 7$ al inhibir la acción de las PTP celulares.

- Caracterizar a nivel de canal único mutantes de $\alpha 7$ que carecen de una o ambas Tyr presentes en el ICD.
- Estudiar el efecto del inhibidor de las SFK sobre la funcionalidad a nivel de corrientes unitarias del mutante de $\alpha 7$ que carece de ambas Tyr en el ICD.
- Examinar a nivel de corrientes macroscópicas la velocidad de desensibilización y de recuperación desde el estado desensibilizado del receptor $\alpha 7$ salvaje, y sus cambios en el receptor que carece de Tyr fosforilables.
- Evaluar la actividad metabotrópica de $\alpha 7$, y determinar el impacto de la inhibición de las SFK y de la mutación en las Tyr del receptor sobre dicha actividad.
- Describir de qué manera se ve afectada la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias al modificar el nivel de actividad de la PKA y de la PKC.
- Explorar las propiedades cinéticas de mutantes simples de $\alpha 7$ que carecen de Ser o Thr potencialmente fosforilables en el ICD.

RESULTADOS

1. Efecto de la fosforilación/desfosforilación de Tyr en el ICD de $\alpha 7$ sobre la función del receptor

En esta primera parte del capítulo se describe el perfil cinético de activación de $\alpha 7$ por ACh a nivel de corrientes unitarias, que será utilizado como control a lo largo de la tesis. A continuación, se explora la modulación de las funciones ionotrópicas y metabotrópicas de $\alpha 7$ como consecuencia de la alteración del estado de fosforilación/desfosforilación de las Tyr del ICD mediante diferentes estrategias: (i) inhibición de PTK; (ii) inhibición de PTP; y (iii) mutantes que carecen de Tyr en el ICD.

1.1. Perfil cinético de $\alpha 7$ a nivel de canal único

Con el objetivo de contar con un control del patrón de activación de $\alpha 7$ a nivel de canal único, el receptor fue expresado de forma heteróloga en células BOSC23 y las corrientes unitarias disparadas por ACh 100 μM (CE_{50}) fueron registradas mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. En estos registros, la actividad del receptor se evidenció mayoritariamente como eventos aislados de aperturas de corta duración, y menos frecuentemente como *bursts* de duración breve (Figura I.1A). Estos últimos son episodios de activación más sostenidos que consisten en una serie de eventos de aperturas rápidas, de una misma molécula de receptor, separadas entre sí por períodos de cierre muy breves, inferiores a cierto $\tau_{\text{crítico}}$. El histograma de duración de estado abierto (histograma de estado abierto) se ajustó con 2 componentes exponenciales, uno de mayor área relativa y menor duración ($\sim 0,1$ ms), y otro de menor área relativa y mayor duración ($\tau_{\text{open}} = 0,30 \pm 0,06$ ms; $n = 38$; $N = 12$; Figura I.1B). Del histograma de duración de estado cerrado (histograma de estado cerrado) se obtuvo el $\tau_{\text{crítico}}$ a partir de la intersección entre el primer y segundo componente exponencial de ajuste (Figura I.1B). Los estados cerrados cuyas duraciones son menores al $\tau_{\text{crítico}}$ se corresponden con tiempos de cierre muy breves que ocurren dentro de los *bursts* (cierre *intra-burst*) y, por lo tanto, sus duraciones no varían con el nivel de expresión del receptor entre células. Por el contrario, aquellos estados cerrados cuyas duraciones son mayores al $\tau_{\text{crítico}}$ se corresponden con cierres que ocurren entre un episodio de activación, aislado o

sostenido, y el siguiente (cierre *interburst*), y por ello, sus duraciones varían según el grado de expresión del receptor en las células y el número de receptores en el parche de membrana que delimita la pipeta. Obtenido de esta manera, el $\tau_{\text{crítico}}$ fue de aproximadamente 0,5 ms. Utilizando este valor se construyó el histograma de duración de *bursts* (histograma de *bursts*), el cual también fue ajustado con dos componentes exponenciales, uno de mayor área relativa y menor duración ($\sim 0,1$ ms), y otro minoritario y de mayor duración ($\tau_{\text{burst}} = 0,46 \pm 0,12$ ms; $n = 38$; $N = 12$; Figura I.1B).

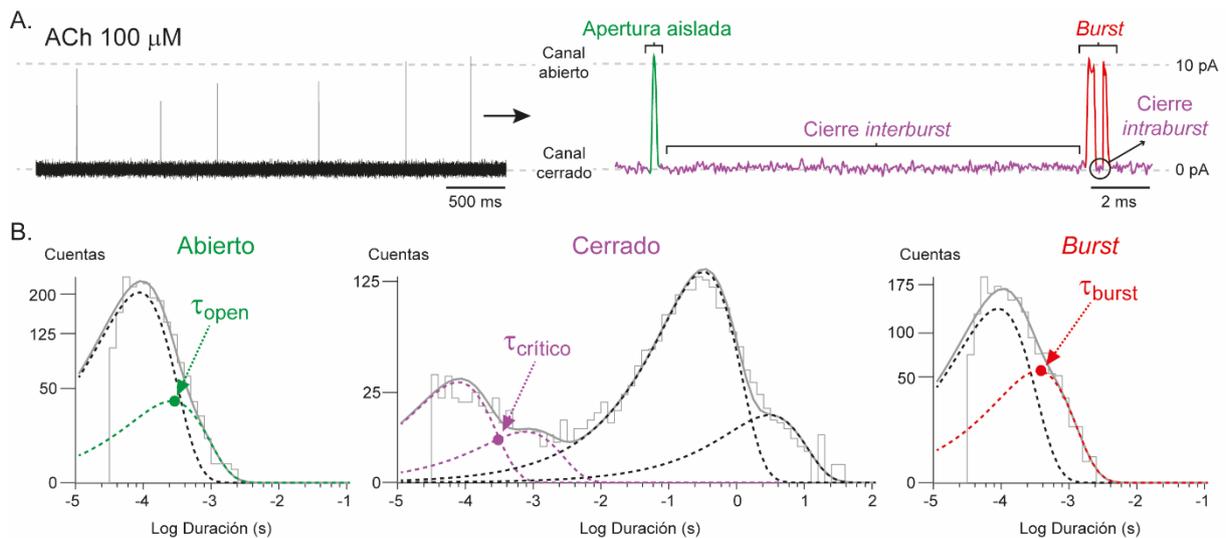


FIGURA I.1. Corrientes de canal único de $\alpha 7$ activadas por ACh.

(A) Registro representativo de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh $100 \mu\text{M}$ obtenido por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. El trazo de los canales se muestra en dos escalas temporales diferentes. En el trazo de la derecha se señala un episodio de activación aislado, a continuación, un cierre *interburst*, y finalmente un episodio de activación sostenido (*burst*), compuesto de dos aperturas separadas por un cierre *intra**burst* muy breve. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas representativos de estado abierto, de estado cerrado y de *bursts* de la condición detallada en (A). En los histogramas de estado abierto y de *bursts* la línea punteada coloreada corresponde al componente más lento (de mayor duración), cuya constante de tiempo (τ), indicada con una flecha, representa la duración media de las aperturas aisladas (τ_{open}) y de los *bursts* (τ_{burst}) respectivamente. En el histograma de estado cerrado las líneas de puntos coloreadas representan los dos componentes de menor duración. El primero es el de menor duración y está compuesto por cierres *intra**burst*, mientras que el segundo es el primer componente de los cierres *interburst*. La flecha señala el punto de intersección entre ambos componentes, que se corresponde con el $\tau_{\text{crítico}}$ utilizado en la construcción del histograma de *bursts*.

1.2. La inhibición de la fosforilación de Tyr aumenta la duración y la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$

Para comenzar a estudiar de qué manera la fosforilación/desfosforilación de Tyr en el ICD de $\alpha 7$ afecta su función ionotrópica, se realizaron registros de corrientes unitarias del receptor en diferentes condiciones experimentales. Para ello se aplicó la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 que expresan de forma heteróloga el receptor $\alpha 7$ humano, lo que permitió obtener registros de gran resolución a nivel de canal único.

1.2.1. La inhibición de las SFK aumenta la duración de los episodios de activación de $\alpha 7$

La primera estrategia aplicada para cambiar el estado de fosforilación consistió en incubar las células expresando $\alpha 7$ con PP2, inhibidor específico de las PTK de la familia de Src. Al inhibir a esta familia de quinasas, que se sabe se asocian y fosforilan al receptor $\alpha 7$ (Charpantier et al., 2005; Komal et al., 2014), se buscó favorecer la acción de las fosfatasas por sobre las quinasas para así promover un estado desfosforilado. Las células en su medio de cultivo fueron incubadas durante una hora con PP2 10 μM o bien con su vehículo (DMSO 0,1 %v/v) como control. A continuación, se registraron las corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas con ACh 100 μM en la pipeta, manteniendo el PP2 o el DMSO en la ECS que baña a las células en las mismas concentraciones utilizadas durante la incubación. Luego, los registros fueron analizados a fin de obtener los parámetros cinéticos del canal en ambas condiciones.

Previamente, con el objetivo de descartar cualquier efecto sobre los canales por la incubación con DMSO 0,1 %v/v, se contrastó el perfil cinético de esa condición contra el control en ausencia de dicho vehículo. En la condición incubada con DMSO 0,1 %v/v, la actividad del canal se evidenció como episodios de activación que en su mayoría se presentaron aislados y en menor grado en la forma de *bursts* (Figura I.2A, trazo superior). El ajuste del histograma de estado abierto se realizó con 2 componentes, y la duración media del componente de mayor duración no tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($\tau_{\text{open}} = 0,32 \pm 0,07$ ms; n = 17; N = 4; p = 0,540). El histograma de estado cerrado arrojó un $\tau_{\text{crítico}}$ de 0,5 ms, el cual fue utilizado para construir el histograma de *bursts*, que fue ajustado con 2 componentes. La duración media

del componente de mayor duración de dicho histograma tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($\tau_{burst} = 0,48 \pm 0,13$ ms; $n = 17$; $N = 4$; $p = 0,719$).

En la condición incubada con PP2 10 μ M, los canales se presentaron nuevamente como aperturas aisladas y *bursts*, pero con la diferencia de que estos últimos se apreciaban visualmente más largos que los del control con DMSO. El ajuste del histograma de estado abierto se realizó también con 2 componentes, y la duración media del componente de mayor duración no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control con DMSO 0,1 %v/v ($\tau_{open} = 0,35 \pm 0,04$ ms; $n = 11$; $N = 3$; $p = 0,150$). En cambio, el histograma de *bursts*, construido con un $\tau_{critico} = 0,5$ ms, debió ajustarse con tres componentes exponenciales debido a la aparición de un tercer componente cuya duración fue significativamente mayor a la del control ($\tau_{burst} = 2,96 \pm 1,30$ ms; $n = 11$; $N = 3$; $p < 0,001$; Figura I.2B). Es decir, la incubación con PP2 10 μ M, que favorece el estado desfosforilado de $\alpha 7$, incrementa aproximadamente seis veces la duración de los *bursts* del receptor sin modificar la duración de las aperturas aisladas (Figura I.2C).

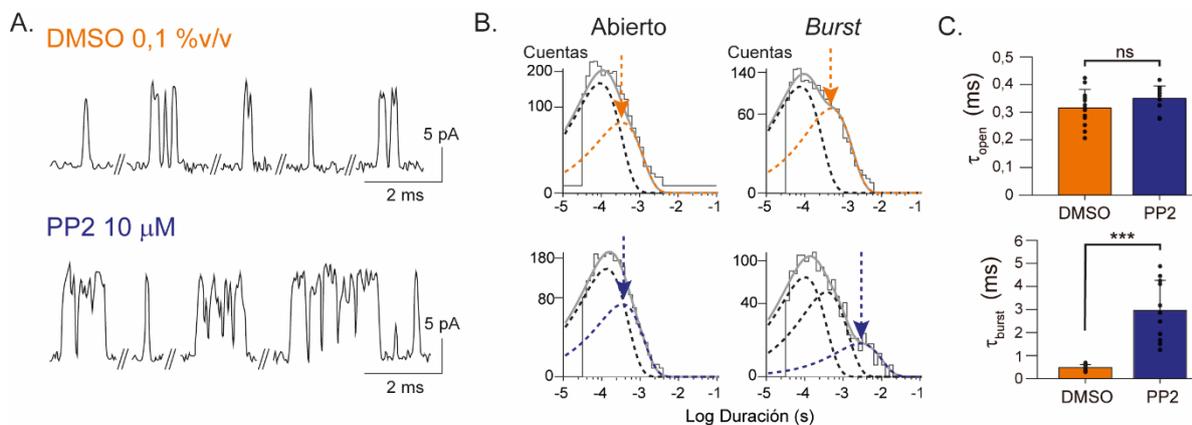


FIGURA I.2. Efecto del PP2 en el perfil cinético de las corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μ M en células incubadas con DMSO (arriba) o PP2 (abajo). Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos señalados con las flechas.

(C) Gráficos de barras de las duraciones de los componentes más lentos del histograma de estado abierto (τ_{open}) y de *bursts* (τ_{burst}) para cada condición. Los datos se muestran como el promedio \pm

SD (n = 17; N = 4 para DMSO; y n = 11; N = 3 para PP2). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones con DMSO (control) y con PP2 (ns: no significativo, $p \geq 0,05$; el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,001^{***}$).

1.2.2. La inhibición de las SFK aumenta la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$

Los experimentos anteriores permitieron realizar una observación que posibilitó el desarrollo de otra estrategia experimental para estudiar el efecto del PP2 sobre la actividad de $\alpha 7$ a nivel de canal único. Dicha observación fue que, en todos los registros obtenidos luego de la incubación con PP2, la frecuencia de los episodios de activación del canal fue mayor que en aquellos obtenidos en paralelo tras la incubación con DMSO. La frecuencia de los episodios de activación entre diferentes registros no es un parámetro que se pueda comparar cuantitativamente ya que depende de la eficacia de la expresión del receptor en esa célula en particular y también del número de receptores que hay en el parche de membrana delimitado por la pipeta en ese sello específico. Sin embargo, el hecho de observar sistemáticamente mayor actividad del canal luego de la incubación con PP2 en comparación con DMSO, sugirió que la inhibición de las SFK no solo incrementa la duración de los *bursts*, sino que también aumenta la frecuencia de los episodios de activación del receptor. Para poner a prueba esta hipótesis, se desarrolló una segunda estrategia experimental para cambiar el estado de fosforilación del receptor, que consistió en la incorporación del inhibidor de las SFK en un registro en curso, y la cuantificación y contrastación del número de episodios de activación por unidad de tiempo (frecuencia) antes y después de dicho agregado. Para el análisis se considera que un episodio de activación puede ser tanto una apertura aislada como un *burst*. En este protocolo, el tramo del registro previo al agregado de la droga sirve como control del tramo del registro posterior al agregado de la misma, ya que se trata de la misma célula y del mismo parche de membrana debajo de la pipeta.

Nuevamente se utilizó la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* para registrar corrientes de canal único de $\alpha 7$ generadas por ACh 100 μM en la solución de pipeta. Luego de un tiempo de registro, definido como “antes”, se agregó a la cápsula el PP2 o el DMSO y se continuó registrando la actividad por el mismo período de tiempo que antes del agregado de la droga, definido como “después” (Figura I.3A). Para estos experimentos, el volumen inicial de la ECS de la cápsula fue de 1,8 mL, y el PP2 o el DMSO se agregaron en 0,2 mL de ECS, en una concentración diez veces mayor a la final deseada

(10 μM o 0,1 %v/v respectivamente). El tiempo de registro previo al agregado de la droga varió entre 4 y 20 minutos según el grado de actividad observado, y fue determinado en el momento que se estaba grabando con el fin de obtener al menos 700-1000 episodios de activación para poder construir los histogramas de estado abierto y de *bursts*. El tiempo de registro posterior a la adición de la droga fue exactamente igual al tiempo antes del agregado de la misma. Esto permite comparar entre “antes” y “después”, no solo la frecuencia de los episodios de activación sino también la duración de dichos episodios (τ_{open} y τ_{burst}). Otro parámetro que se cuantificó fue la probabilidad de apertura del canal (nP_o), que se define como la relación entre el tiempo en el cual el canal se encuentra en estado abierto y el tiempo total de registro. Este parámetro es muy interesante porque depende tanto de la frecuencia como de la duración de los episodios de activación.

En cada registro, para los cuatro parámetros medidos (frecuencia de episodios de activación, nP_o , τ_{open} y τ_{burst}) se determinó la relación después/antes. En la condición control se observó una leve disminución en la frecuencia de los episodios de activación (relación después/antes = $0,78 \pm 0,09$) y en la nP_o (relación después/antes = $0,75 \pm 0,13$) luego del agregado de DMSO a la cápsula ($n = 9$; $N = 6$; Figura I.3B). Esta pequeña reducción se debe a la esperada desensibilización del receptor $\alpha 7$ que ocurre a lo largo del tiempo de registro por la presencia continua de ACh en la pipeta. Igualmente, para descartar que no haya sido un efecto del DMSO, se realizaron controles en donde se agregó 0,2 mL de ECS en lugar del vehículo. En estas condiciones, tras el agregado de la ECS, también se evidenció una leve caída en la frecuencia de los episodios de activación (relación después/antes = $0,85 \pm 0,04$) y en la nP_o (relación después/antes = $0,83 \pm 0,03$), que fue similar ($n = 6$; $N = 3$; $p = 0,092$ y $p = 0,161$ respectivamente) a la observada con DMSO, descartando de esta manera que el solvente sea el responsable de la disminución de la actividad del canal a lo largo del registro.

En contraposición, el agregado de PP2 hasta una concentración final 10 μM produjo un aumento estadísticamente significativo de más de dos veces en la frecuencia de los episodios de activación (relación después/antes = $2,18 \pm 0,88$; $n = 6$; $N = 3$; $p = 0,002$) y de más de tres veces en la nP_o (relación después/antes = $3,18 \pm 1,54$; $n = 6$; $N = 3$; $p = 0,002$) comparado con la condición con DMSO (Figura I.3B y C). El incremento mayor de la nP_o con respecto a la frecuencia puede explicarse considerando que la probabilidad de apertura incluye no solo la frecuencia sino también la duración de los episodios de activación, y que como se demostró previamente, la incubación con PP2 produce un

aumento en la duración de los *bursts*. Para corroborar este efecto cinético en el protocolo de agregado de la droga durante el curso del registro, se determinaron las duraciones medias de las aperturas aisladas y de los *bursts* antes y después de DMSO o PP2. Ambos parámetros permanecieron constantes tras el agregado de DMSO 0,1 %v/v: τ_{open} relación después/antes = $0,99 \pm 0,16$ (τ_{open} antes = $0,29 \pm 0,04$ ms y τ_{open} después = $0,28 \pm 0,05$ ms; n = 9; N = 6; p = 0,771); y τ_{burst} relación después/antes = $0,99 \pm 0,10$ (τ_{burst} antes = $0,42 \pm 0,08$ ms y τ_{burst} después = $0,42 \pm 0,08$ ms; n = 9; N = 6; p = 0,724). Por el contrario, después de la adición de PP2 10 μ M, ambas duraciones mostraron un aumento estadísticamente significativo: τ_{open} relación después/antes = $1,36 \pm 0,12$ (τ_{open} antes = $0,24 \pm 0,07$ ms y τ_{open} después = $0,33 \pm 0,07$ ms; n = 6; N = 3; p = 0,003); y τ_{burst} relación después/antes = $5,01 \pm 1,24$ (τ_{burst} antes = $0,38 \pm 0,06$ ms y τ_{burst} después = $1,88 \pm 0,40$ ms; n = 6; N = 3; p = 0,002; Figura I.3C).

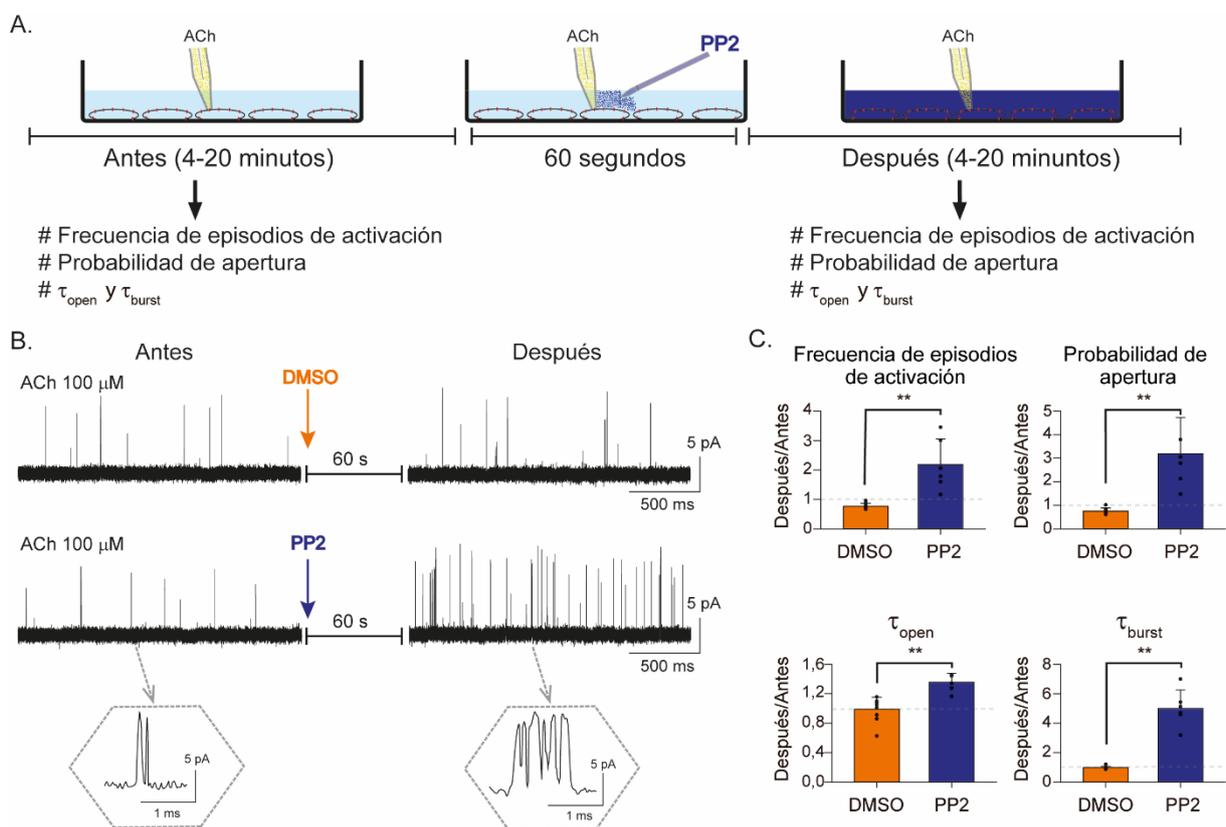


FIGURA I.3. Efecto del PP2 en el grado de actividad de $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias.

(A) Esquema ilustrativo del segundo diseño experimental aplicado para estudiar el efecto del PP2 sobre la actividad de $\alpha 7$ a nivel de canal único. El tiempo registrado antes es igual al registrado luego de la adición de la droga. Los 60 segundos luego del agregado del inhibidor se dejaron para asegurar la correcta difusión del mismo y para que se establezca el efecto sobre los canales.

(B) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de DMSO 0,1 %v/v (arriba) o PP2 10 μM (abajo). En los recuadros se muestran con mayor amplificación los eventos típicos antes (izquierda) y después (derecha) del agregado del inhibidor de las SFK. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(C) Gráficos de barras que muestran las relaciones después/antes en la frecuencia de los episodios de activación, nP_o , τ_{open} y τ_{burst} debido a la adición de DMSO o PP2. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: DMSO (n = 9; N = 6) y PP2 (n = 6; N = 3). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre ambas condiciones (el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,01^{**}$).

1.2.3. La coexpresión de $\alpha 7$ y la quinasa Src inactiva incrementa la duración de los *bursts* del receptor

Por último, la tercera estrategia aplicada para favorecer un estado desfosforilado del receptor consistió en la cotransfección de los ADNc de la subunidad $\alpha 7$ y de una quinasa Src inactiva (Src-K297R). La mutación K297R en el sitio de unión a ATP de dicha quinasa la hace incapaz de catalizar la reacción de fosforilación. El supuesto de esta estrategia se basa en que la sobreexpresión de la Src inactiva competiría con la Src endógena de la célula por la fosforilación de las Tyr del ICD, y llevaría el balance hacia un estado desfosforilado del receptor. Los registros de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas con ACh 100 μM obtenidas a partir de células coexpresando $\alpha 7$ y Src-K297R mostraron que no hubo cambios estadísticamente significativos en la duración media de las aperturas aisladas con respecto al control donde solo se expresó $\alpha 7$ ($\tau_{\text{open}} = 0,35 \pm 0,10$ ms; n = 4; N = 2; p = 0,212), pero si se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en la duración media de los *bursts* ($\tau_{\text{burst}} = 0,65 \pm 0,10$ ms; n = 4; N = 2; p = 0,005).

Esta serie de experimentos demostró que favorecer un estado desfosforilado de $\alpha 7$, ya sea por inhibición de las SFK o por coexpresión de una Src inactiva, aumenta tanto la duración como la frecuencia de los episodios de activación del canal, es decir, incrementa la probabilidad de encontrar al receptor en un estado abierto.

1.3. La inhibición de la desfosforilación de fosfotirosinas disminuye la duración de los episodios de activación de $\alpha 7$

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en donde desfavorecer la fosforilación de Tyr aumenta la duración de los episodios de activación de $\alpha 7$, se hipotetizó que llevar el balance hacia un estado fosforilado tendría el efecto opuesto. Para este fin se utilizó pervanadato, que es un inhibidor general de las PTP. Como se detalló previamente, la duración de las aperturas de $\alpha 7$ a nivel de canal único tras la activación con ACh 100 μM están en el orden de los submilisegundos, lo cual es muy cercano al límite de resolución temporal del sistema de adquisición de datos. Por ello, la detección de una disminución en estas duraciones, como la que se espera al favorecer la fosforilación, no es viable desde el punto de vista técnico. Para superar esta limitación, se utilizó un PAM de $\alpha 7$ que incrementa la duración de los episodios de activación. Se eligió 5-HI, que es un PAM tipo I, cuyos efectos a nivel de canal único han sido bien descritos (N. D. Andersen et al., 2016).

En los registros obtenidos en la configuración *cell-attached* sobre células sin incubación previa (control), la actividad del receptor $\alpha 7$ por la acción conjunta de ACh 100 μM y 5-HI 2 mM en la pipeta se manifestó como aperturas aisladas y *bursts* de mayor duración comparados con la condición con ACh 100 μM . En presencia de 5-HI 2 mM, las duraciones de los episodios de activación fueron significativamente mayores que en su ausencia ($\tau_{\text{open}} = 1,28 \pm 0,35$ ms; $p < 0,001$; y $\tau_{\text{burst}} = 3,60 \pm 1,29$ ms; $p < 0,001$; $n = 37$; $N = 11$) (Figura I.4A y B). Para favorecer la acción de las PTK por sobre las PTP, y así alterar el balance hacia la fosforilación, se incubaron las células expresando $\alpha 7$ con pervanadato 100 μM por una hora, manteniendo luego el inhibidor en la ECS de la cápsula durante el registro. En estas condiciones, los registros obtenidos con ACh 100 μM y 5-HI 2 mM, evidenciaron una reducción estadísticamente significativa en las duraciones de las aperturas aisladas y de los *bursts* con respecto al control ($\tau_{\text{open}} = 0,67 \pm 0,31$ ms; $p < 0,001$; y $\tau_{\text{burst}} = 1,36 \pm 0,58$ ms; $p < 0,001$; $n = 19$; $N = 4$) (Figura I.4A, B y C).

Por otro lado, también se evaluó si favorecer el estado fosforilado de $\alpha 7$ afecta la amplitud de los canales unitarios, parámetro que se relaciona con la conductancia unitaria del canal. En los registros de canal único del receptor activado con ACh 100 μM y a un potencial de membrana de -70 mV existen canales con una amplia gama de amplitudes. Esto se debe a que, en las aperturas que son muy breves, la resolución de la amplitud

puede ser incompleta por una limitante de la frecuencia de adquisición, y por ello el canal se ve como si tuviera una amplitud menor. El uso de un PAM, que aumenta la duración de los eventos, permite salvar esta limitación técnica, por ello, en presencia de 5-HI y considerando solo eventos de más de 0,2 ms, es posible construir los histogramas para resolver la amplitud del canal (N. Andersen et al., 2013b; Bouzat et al., 2008; Nielsen et al., 2019). En la condición control (sin pervanadato), el histograma de amplitud de los eventos de $\alpha 7$ disparados por ACh y 5-HI se ajustó por el método de máxima probabilidad mediante una función gaussiana con un componente cuyo valor fue de $9,90 \pm 0,25$ pA ($n = 4$; $N = 4$; Figura I.4D). En los registros obtenidos a partir de las células tratadas con pervanadato, la amplitud de los eventos no fue significativamente diferente a la del control ($10,18 \pm 0,32$ pA; $n = 4$; $N = 3$; $p = 0,212$; Figura I.4D).

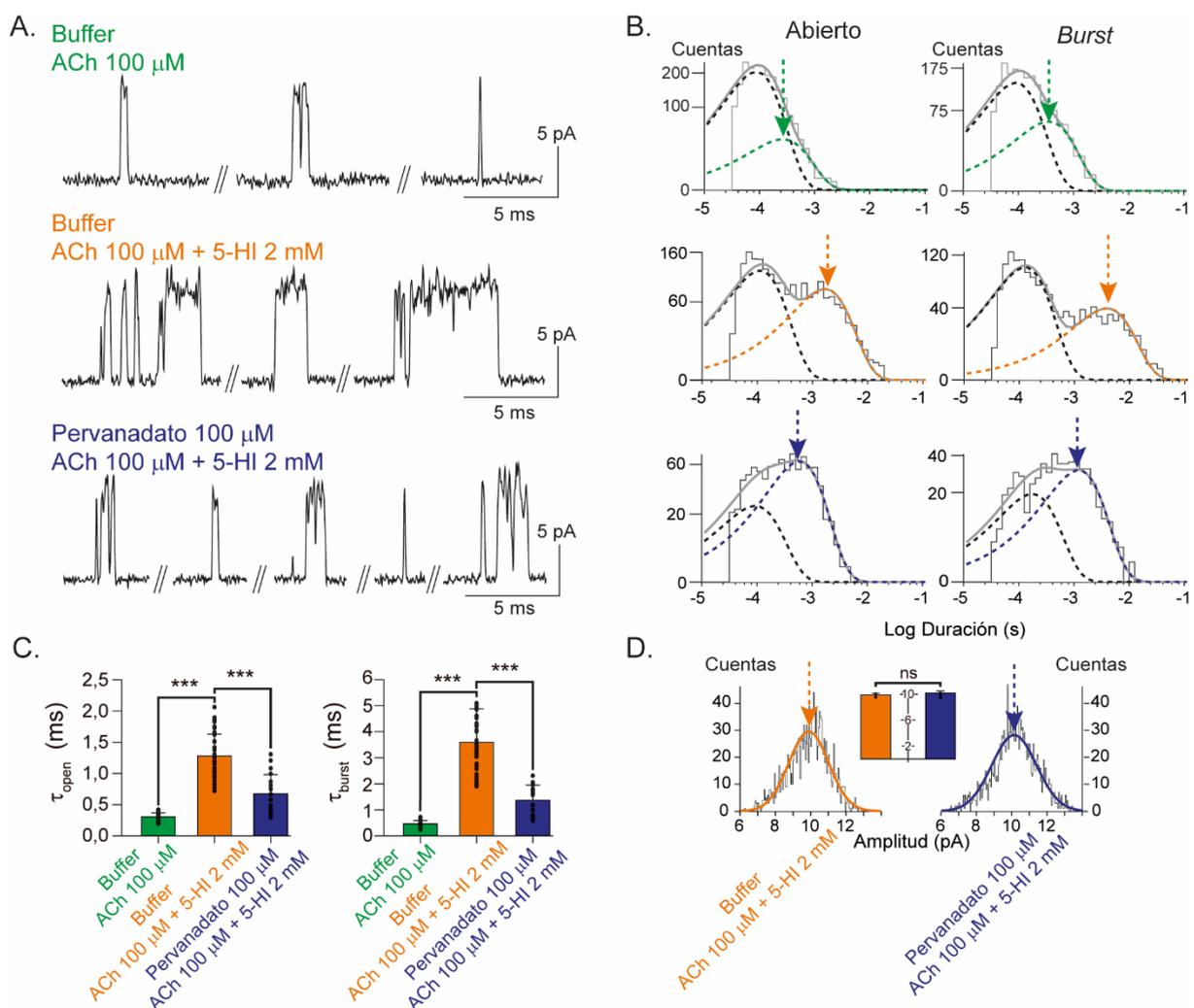


FIGURA I.4. Efecto del pervanadato en el perfil cinético de las corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh y potenciadas por 5-HI.

(A) Registros representativos de canal único de $\alpha 7$ activado por ACh 100 μM en ausencia de 5-HI (arriba), en presencia de 5-HI 2 mM (medio), y en presencia de 5-HI 2 mM previo tratamiento con pervanadato 100 μM (abajo). Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos señalados con las flechas.

(C) Gráficos de barras de las duraciones de los componentes más lentos del histograma de estado abierto (τ_{open}) y de *bursts* (τ_{burst}) para cada condición. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 38$; $N = 12$ para buffer-ACh; $n = 37$; $N = 11$ para buffer-ACh 100 + 5-HI; y $n = 19$; $N = 4$ para pervanadato-ACh + 5-HI). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones: (i) buffer-ACh y buffer-ACh + 5-HI; y (ii) buffer-ACh + 5-HI y pervanadato-ACh + 5-HI (el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,001^{***}$).

(D) Histogramas representativos de amplitud para las condiciones buffer-ACh + 5-HI y pervanadato-ACh + 5-HI. Las flechas indican el valor de la amplitud dado por el componente de ajuste de la función gaussiana. En el centro se muestra el gráfico de barras de la amplitud media para cada condición. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 4$; $N = 4$ para buffer-ACh + 5-HI; y $n = 4$; $N = 3$ para pervanadato-ACh + 5-HI). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre ambas condiciones (ns: no significativo, $p \geq 0,05$).

Esta serie de resultados permitió demostrar que la duración de los episodios de activación de $\alpha 7$, activado con ACh y potenciado con 5-HI, se reduce al favorecer un estado fosforilado del receptor, por inhibición de las PTP, sin verse alterada la amplitud de los canales.

1.4. El receptor $\alpha 7$ mutante que carece de Tyr fosforilables en el ICD tiene episodios de activación de mayor duración que el receptor salvaje

Se realizó un análisis de la secuencia aminoacídica de $\alpha 7$ con el programa NetPhos 3.1 para identificar residuos Tyr con el potencial de ser fosforilados. Los resultados obtenidos indicaron que las dos Tyr del ICD (Y386 e Y442) podrían ser fosforiladas. El valor de predicción del programa fue más alto para la Tyr-442 que para la Tyr-386. Mediante un protocolo de mutagénesis dirigida se generó un receptor mutante que carece de ambas Tyr por haber sido sustituidas por fenilalaninas: $\alpha 7$ -Y386F/Y442F. Este receptor mutante fue expresado en células BOSC23 para luego ser caracterizado a nivel de canal único mediante registros obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* con ACh 100 μM en la pipeta (Figura I.5A). Luego de la construcción de los histogramas correspondientes (Figura I.5B), se demostró que el

receptor mutante posee similar duración de las aperturas aisladas ($\tau_{open} = 0,32 \pm 0,05$ ms; $n = 12$; $N = 5$; $p = 0,375$), pero mayor duración de los *bursts* ($\tau_{burst} = 0,63 \pm 0,14$ ms; $n = 12$; $N = 5$; $p = 0,000326$) que el receptor salvaje (Figura I.5C). Este incremento fue similar al observado en los *bursts* del receptor salvaje cuando fue coexpresado con Src-K297R, una condición que favorece el estado desfosforilado ($p = 0,756$). Por otra parte, considerando solo eventos de duración mayor a 0,2 ms, se construyó el histograma de amplitud de las corrientes unitarias del receptor mutante, obteniendo un valor de amplitud media de $9,92 \pm 0,29$ pA ($n = 4$; $N = 3$; Figura I.5D) que no difiere de la amplitud media de las corrientes del receptor salvaje ($9,91 \pm 0,19$ pA; $n = 4$; $N = 4$; $p = 0,951$).

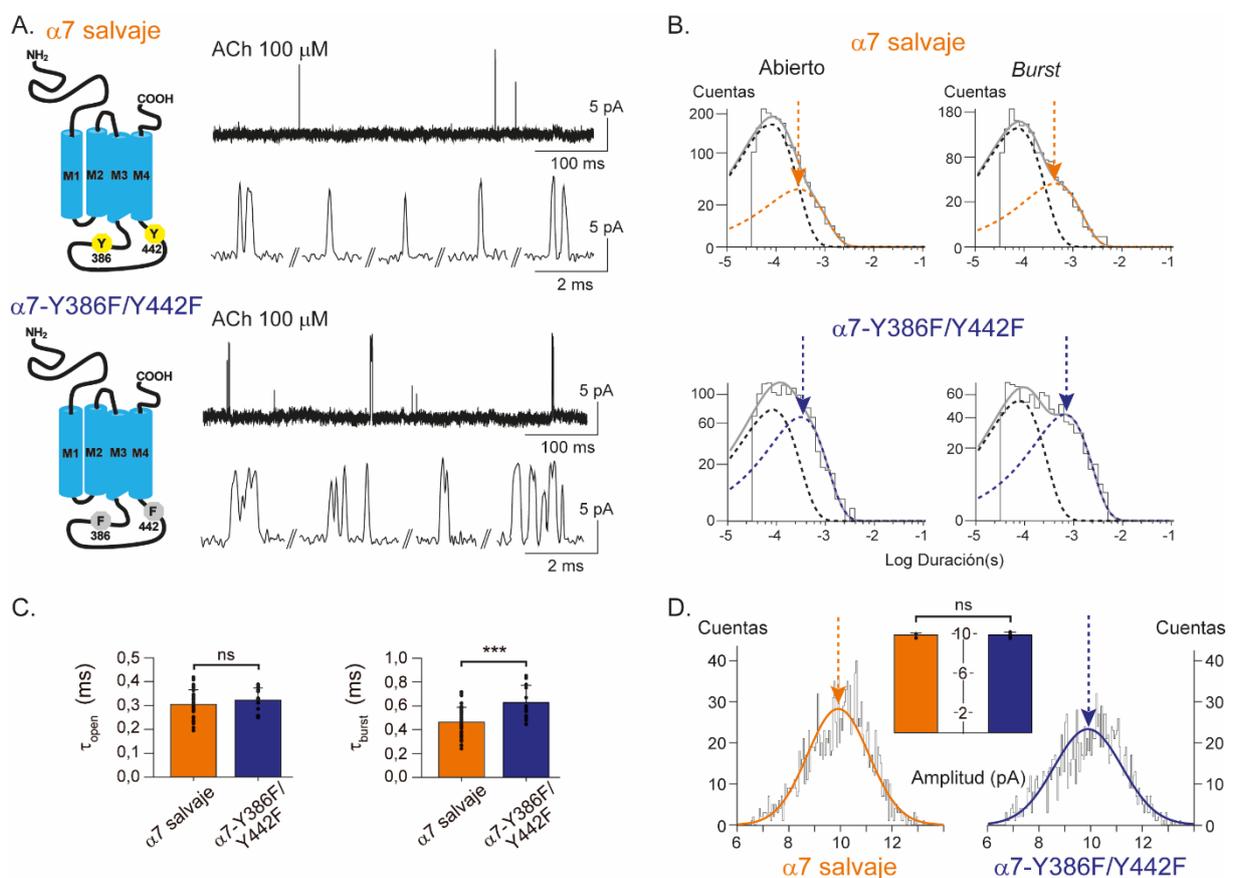


FIGURA I.5. Caracterización a nivel de canal único del receptor $\alpha 7$ -Y386F/Y442F.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ salvaje (arriba) y de $\alpha 7$ -Y386F/Y442F (abajo) activadas por ACh 100 μ M obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. El trazo de los canales se muestra en dos escalas temporales diferentes. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada receptor. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos señalados con las flechas.

(C) Gráficos de barras de las duraciones de los componentes más lentos del histograma de estado abierto (τ_{open}) y de *bursts* (τ_{burst}) para cada receptor. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 38$; $N = 12$ para $\alpha 7$ salvaje; y $n = 12$; $N = 5$ para $\alpha 7$ -Y386F/Y442F). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre $\alpha 7$ salvaje y $\alpha 7$ -Y386F/Y442F (ns: no significativo, $p \geq 0,05$; el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,001^{***}$).

(D) Histogramas representativos de amplitud para $\alpha 7$ salvaje y $\alpha 7$ -Y386F/Y442F. Las flechas indican el valor de la amplitud dado por el componente de ajuste de la función gaussiana. En el centro se muestra el gráfico de barras de la amplitud media para cada condición. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 4$; $N = 4$ para $\alpha 7$ salvaje; y $n = 4$; $N = 3$ para $\alpha 7$ -Y386F/Y442F). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre ambos receptores (ns: no significativo, $p \geq 0,05$).

Para poder discriminar cuál de los residuos de Tyr media los efectos en la cinética del canal, se analizó la duración de los *bursts* de dos mutantes simples generados por mutagénesis dirigida: $\alpha 7$ -Y386F y $\alpha 7$ -Y442F. Ambos receptores presentaron duraciones levemente mayores que el receptor salvaje, lo que indica una tendencia a duraciones más largas ($\tau_{burst} = 0,52 \pm 0,17$ ms; $n = 5$; $N = 4$ para $\alpha 7$ -Y386F; y $0,52 \pm 0,05$ ms; $n = 5$; $N = 3$ para $\alpha 7$ -Y442F), sin embargo, para ninguno de los dos el aumento fue estadísticamente significativo ($p = 0,322$ para $\alpha 7$ -Y386F; y $p = 0,352$ para $\alpha 7$ -Y442F; Figura I.6). Por lo tanto, el efecto de la fosforilación sobre la cinética del canal es dependiente del número de Tyr que pueden fosforilarse.

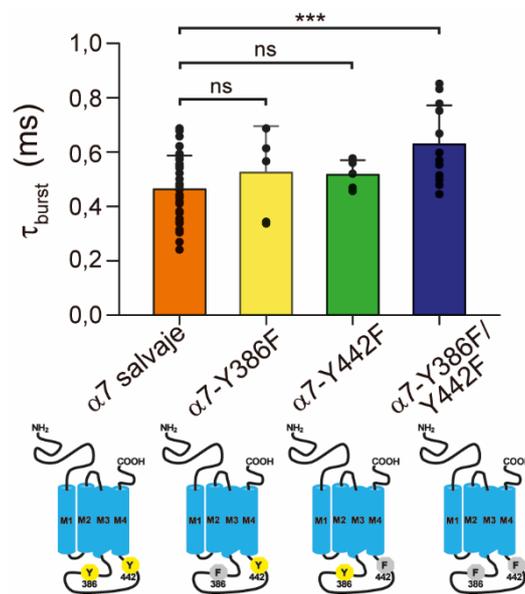


FIGURA I.6. Impacto del número de Tyr mutadas en el ICD de $\alpha 7$ sobre la duración de los *bursts* del receptor.

Gráfico de barras de las duraciones de los componentes más lentos del histograma de *burst* (τ_{burst}) para los receptores $\alpha 7$ salvaje, $\alpha 7$ -Y386F, $\alpha 7$ -Y442F y $\alpha 7$ -Y386F/Y442F. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 38$; $N = 12$ para $\alpha 7$ salvaje; $n = 5$; $N = 4$ para $\alpha 7$ -Y386F; $n = 5$; $N = 3$

para $\alpha 7$ -Y442F; y $n = 12$; $N = 5$ para $\alpha 7$ -Y386F/Y442F). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre $\alpha 7$ salvaje y los demás receptores mutantes (ns: no significativo, $p \geq 0,05$; el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,001^{***}$).

Como se demostró anteriormente en este capítulo de la tesis, el agregado de PP2 durante el transcurso de un registro de $\alpha 7$ salvaje provoca un aumento en la duración y frecuencia de los episodios de activación (Figura I.3). Para confirmar la participación de las Tyr-386 y Tyr-442 en estos efectos, se utilizó el mutante $\alpha 7$ -Y386F/Y442F que, al carecer de ambos residuos, debería ser insensible a la acción del inhibidor de las SFK. Para ello, dicho mutante fue expresado en células BOSC23, y su actividad fue registrada a nivel de corrientes unitarias en la configuración *cell-attached*, antes y después del agregado de PP2 10 μM o DMSO 0,1 %v/v (Figura I.7A). Con estos registros se midieron los mismos cuatro parámetros que en los experimentos realizados con el receptor salvaje (frecuencia de episodios de activación, nP_o , τ_{open} y τ_{burst}), y se expresaron como la relación después/antes de PP2 o DMSO. La frecuencia de los episodios de activación se vio reducida levemente tras el agregado de PP2 (relación después/antes = $0,84 \pm 0,15$; $n = 5$; $N = 3$), siendo esta disminución similar a la que tuvo lugar luego del agregado de DMSO (relación después/antes = $0,83 \pm 0,04$; $n = 4$; $N = 4$; $p = 0,853$), debido a la desensibilización del receptor a lo largo del registro. La duración de las aperturas aisladas del receptor $\alpha 7$ -Y386F/Y442F tampoco sufrió cambios por efecto del PP2 (τ_{open} antes = $0,30 \pm 0,04$ ms y τ_{open} después = $0,29 \pm 0,02$ ms; $n = 5$; $N = 3$; $p = 0,619$), y la relación después/antes fue similar a la obtenida con el agregado de DMSO ($0,98 \pm 0,12$; $n = 5$; $N = 3$ para PP2, y $0,97 \pm 0,08$; $n = 4$; $N = 4$ para DMSO; $p = 0,937$). De la misma forma, la duración de los *bursts* en el mutante no cambió por acción del PP2 (τ_{burst} antes = $0,62 \pm 0,08$ ms y τ_{burst} después = $0,61 \pm 0,07$ ms; $n = 5$; $N = 3$; $p = 0,823$), y la relación después/antes fue similar a la obtenida tras la adición de DMSO ($0,98 \pm 0,03$; $n = 5$; $N = 3$ para PP2, y $1,00 \pm 0,05$; $n = 4$; $N = 4$ para DMSO; $p = 0,611$). Finalmente, con respecto a la nP_o , en los registros de $\alpha 7$ -Y386F/Y442F tampoco se encontró diferencia entre el agregado de DMSO (relación después/antes = $0,81 \pm 0,01$; $n = 4$; $N = 4$;) y de PP2 (relación después/antes = $0,86 \pm 0,21$; $n = 5$; $N = 3$; $p = 0,675$).

Estos resultados permiten concluir que, de manera contraria a lo que sucede con el receptor $\alpha 7$ salvaje, el mutante es insensible al efecto del inhibidor de las SFK. Para enfatizar estas diferencias de comportamiento entre ambos receptores se compararon las relaciones después/antes de PP2 10 μM para los cuatro parámetros mencionados,

encontrándose significancia estadística en cada uno de ellos ($p = 0,00873$ para la frecuencia de los episodios de activación; $p = 0,00884$ para la nP_o ; $p = 0,004$ para la τ_{open} ; y $p = 0,004$ para la τ_{burst} ; Figura I.7B).

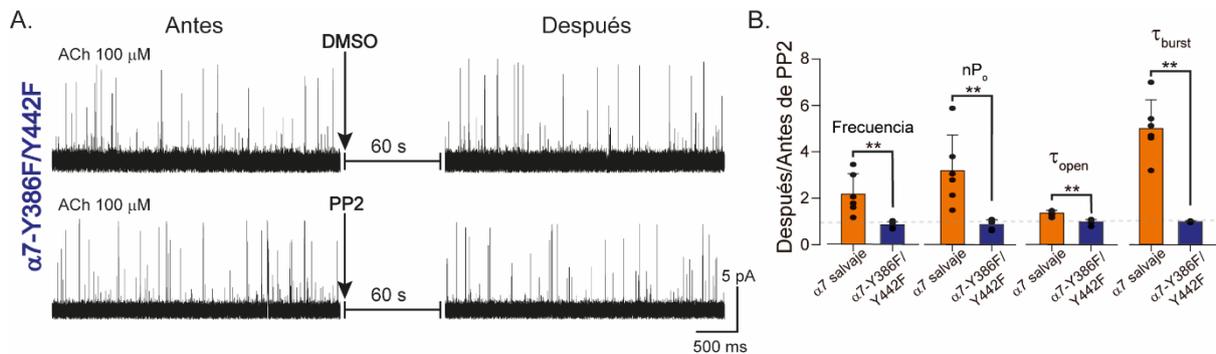


FIGURA I.7. El receptor $\alpha7$ -Y386F/Y442F es insensible al efecto del PP2.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha7$ -Y386F/Y442F activadas por ACh 100 μM obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de DMSO 0,1 %v/v (arriba) o PP2 10 μM (abajo). Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráfico de barras que muestra las relaciones después/antes en la frecuencia de los episodios de activación, nP_o , τ_{open} y τ_{burst} de los receptores $\alpha7$ salvaje y $\alpha7$ -Y386F/Y442F debido a la adición de PP2 10 μM . Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para $\alpha7$ salvaje ($n = 6$; $N = 3$) y $\alpha7$ -Y386F/Y442F ($n = 5$; $N = 3$). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre ambos receptores (el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,01^{**}$).

Este conjunto de experimentos permitió demostrar que, el receptor mutante que carece de Tyr fosforilables en el ICD posee episodios de activación sostenidos de mayor duración y similar amplitud que el receptor salvaje, y además es insensible a los efectos del inhibidor de SFK, es decir, se comporta como un receptor salvaje desfosforilado.

1.5. La fosforilación de las Tyr del ICD de $\alpha7$ favorece el estado desensibilizado del receptor

Para profundizar más en los mecanismos que subyacen a los efectos observados de la fosforilación sobre las corrientes unitarias de $\alpha7$, se realizaron registros de corrientes macroscópicas por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* en células BOSC23 expresando receptores $\alpha7$ salvaje o $\alpha7$ -Y386F/Y442F. Se analizó la cinética de

activación y desensibilización de dichas corrientes y, también, la velocidad de recuperación de los receptores desde el estado desensibilizado.

En primera instancia, con el fin de estudiar el curso temporal de la recuperación de la desensibilización, sobre células BOSC23 expresando receptores $\alpha 7$ salvaje o $\alpha 7$ -Y386F/Y442F, se aplicó el protocolo de pulso doble pareado que consiste en medir la relación entre las corrientes provocadas por dos pulsos de ACh (control y de testeo) separados por un intervalo de lavado (interpulso). Para ambos receptores, luego del pulso control y tras un interpulso de 100 y 200 ms, no hubo respuestas macroscópicas con el pulso de testeo. Para el receptor salvaje, el segundo pulso siguió sin producir corrientes detectables hasta 600-800 ms de lavado. En cambio, en el mutante al cabo de 300-400 ms de interpulso empezaron a detectarse pequeñas corrientes (Figura I.8A). Para cuantificar estas diferencias, se calculó el porcentaje de recuperación de la corriente control para cada intervalo de lavado (entre 100 ms y 6000 ms) mediante la relación entre la amplitud del pico originado por el pulso de testeo y la amplitud del pico evocado por el pulso control. Para cada receptor, este porcentaje fue graficado en función del tiempo de interpulso, obteniéndose una curva que fue ajustada mediante una función exponencial. De esta función se obtuvo el valor de la constante de tiempo de recuperación del receptor (τ_r). La figura I.8B muestra la media y el desvío estándar del porcentaje de recuperación en función de la duración del interpulso para diferentes experimentos en el receptor salvaje y en el mutante. Estos resultados demostraron que la recuperación de la desensibilización del receptor $\alpha 7$ -Y386F/Y442F ($\tau_r = 664 \pm 200$ ms; $n = 8$; $N = 3$) es tres veces más rápida que la del receptor salvaje ($\tau_r = 1930 \pm 550$ ms; $n = 8$; $N = 3$; $p < 0,001$).

Por otro lado, también se estudió la cinética de activación y desensibilización de ambos receptores. La aplicación rápida de un pulso de 300 ms de ACh 1 mM en células que expresan $\alpha 7$ salvaje o $\alpha 7$ -Y386F/Y442F generó una corriente macroscópica que llegó a su pico máximo en 5-10 ms, y que decayó en presencia del agonista debido a la desensibilización de los receptores (Figura I.8C). El decaimiento de la corriente se ajustó con una función exponencial simple, a partir de la cual se obtuvo la constante de decaimiento (τ_d). En los registros obtenidos a partir del receptor salvaje la velocidad de decaimiento de las corrientes en presencia de agonista ($\tau_d = 28,9 \pm 6,5$ ms; $n = 7$; $N = 3$) fue significativamente mayor que en los registros del mutante ($\tau_d = 39,1 \pm 7,1$ ms; $n = 7$; $N = 3$; $p = 0,0165$; Figura I.8C).

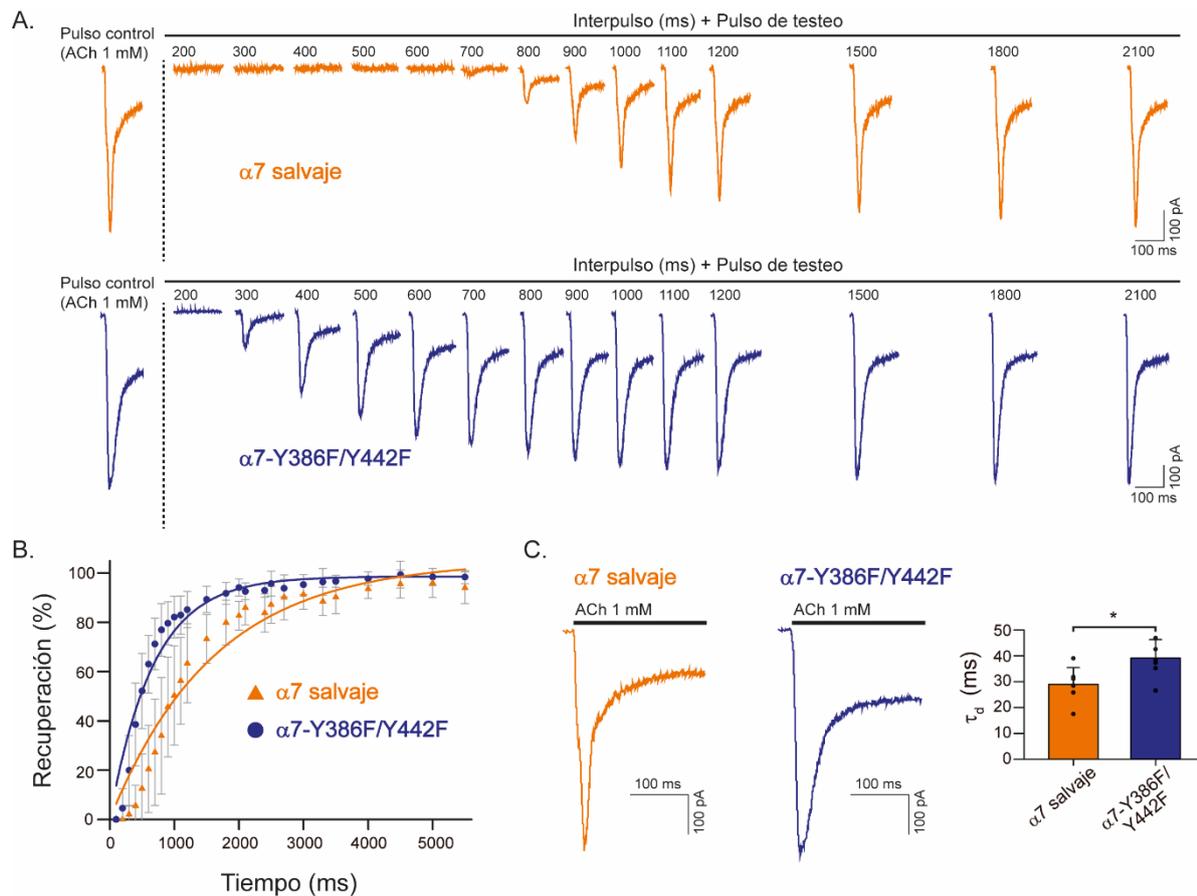


FIGURA 1.8. Corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ salvaje y $\alpha 7$ -Y386F/Y442F.

(A) A la izquierda se muestran corrientes macroscópicas representativas de $\alpha 7$ salvaje (arriba) y $\alpha 7$ -Y386F/Y442F (abajo) obtenidas por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* tras un pulso control de 300 ms de ACh 1 mM. A la derecha se muestran las corrientes evocadas en la misma célula por un segundo pulso de 300 ms de ACh 1 mM (pulso de testeo) luego de distintos tiempos de lavado con ECS (interpulso). Potencial de membrana: -50 mV.

(B) Curvas de recuperación de la desensibilización (%) en función del tiempo de lavado (ms) para ambos receptores. Para cada intervalo de tiempo el porcentaje de recuperación se calculó como la relación entre el pico máximo de corriente del segundo y del primer pulso de agonista. Los datos corresponden al promedio \pm SD ($n = 8$; $N = 4$ para $\alpha 7$ salvaje; y $n = 8$; $N = 4$ para $\alpha 7$ -Y386F/Y442F).

(C) Corrientes macroscópicas representativas de $\alpha 7$ salvaje (izquierda) y $\alpha 7$ -Y386F/Y442F (derecha) obtenidas por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole-cell* tras un pulso de ACh 1 mM. Potencial de membrana: -50 mV. El gráfico de barras muestra las constantes de decaimiento de ambos receptores. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 7$; $N = 3$ para $\alpha 7$ salvaje; y $n = 7$; $N = 3$ para $\alpha 7$ -Y386F/Y442F). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre ambos receptores (el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,05^*$).

Por lo tanto, de estos ensayos a nivel de corrientes macroscópicas, se puede concluir que la ausencia de Tyr susceptibles de ser fosforiladas en el ICD de $\alpha 7$ disminuye la

velocidad de desensibilización del receptor desde el estado abierto, e incrementa la velocidad de recuperación desde el estado desensibilizado hacia el estado cerrado disponible para volver a abrirse.

1.6. La fosforilación de las Tyr del ICD está involucrada en las respuestas metabotrópicas de $\alpha 7$

Teniendo en cuenta el rol dual ionotrópico-metabotrópico que tiene el receptor $\alpha 7$, se decidió explorar si la fosforilación/desfosforilación de las Tyr del ICD afecta las vías de señalización que se accionan luego de la activación del receptor. Para ello se eligió estudiar la vía de ERK 1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*) que se dispara tras la activación de $\alpha 7$ y está asociada a la protección neuronal (Toborek et al., 2007).

En primer lugar, es importante validar el modelo experimental antes de aplicar una estrategia para alterar el estado de fosforilación del receptor. Por ello, se procedió a demostrar que la vía de ERK 1/2 es disparada tras la activación de $\alpha 7$ en células BOSC23 que expresan el receptor de forma heteróloga. Se utilizó PNU-282987 como agonista específico de $\alpha 7$ para evocar la respuesta metabotrópica del receptor, que fue medida por *western blot*. Mediante esta técnica, se puso en evidencia que la aplicación de un pulso de PNU-282987 10 μM durante 2,5-5 minutos sobre las células que expresan $\alpha 7$ lleva a un incremento significativo en la fosforilación de ERK 1/2 (p-ERK 1/2) con respecto a las células expuestas al vehículo del agonista (Figura I.9A), confirmando de esta manera la activación de la vía en el sistema experimental.

A continuación, se investigó si la inhibición de las SFK, que incrementa la actividad ionotrópica de $\alpha 7$, tiene efecto en la actividad metabotrópica del receptor estudiada por la vía de ERK 1/2. Para ello, las células expresando el receptor salvaje fueron tratadas por 30 minutos con una concentración 10 μM de SU6656, a fin de inhibir a las SFK celulares. Dicho tratamiento eliminó la señal de p-ERK 1/2 disparada tras la activación de $\alpha 7$ con PNU-282987 (Figura I.9B). Como control, se demostró que el tratamiento con SU6656 10 μM no afectó al contenido de p-ERK 1/2 en células no expuestas al agonista con respecto a la condición basal (Figura I.9B). Para confirmar que el efecto negativo del inhibidor de las SFK está relacionado específicamente a la fosforilación de $\alpha 7$, se midió el contenido de p-ERK 1/2 luego del pulso de PNU-282987 en células BOSC23 expresando el receptor mutante $\alpha 7$ -Y386F/Y442F en ausencia de SU6656. En esta condición no se detectó señal de p-ERK 1/2 (Figura I.9B), indicando que los residuos Tyr en el ICD de $\alpha 7$ son necesarios

para la vía de ERK 1/2 que se dispara tras la activación del receptor. Como control adicional, en paralelo, se verificó la expresión y funcionalidad del receptor $\alpha 7$ -Y386F/Y442F por medio de registros electrofisiológicos de corrientes unitarias en el mismo lote de células con que se trabajó para los experimentos de *western blot*.

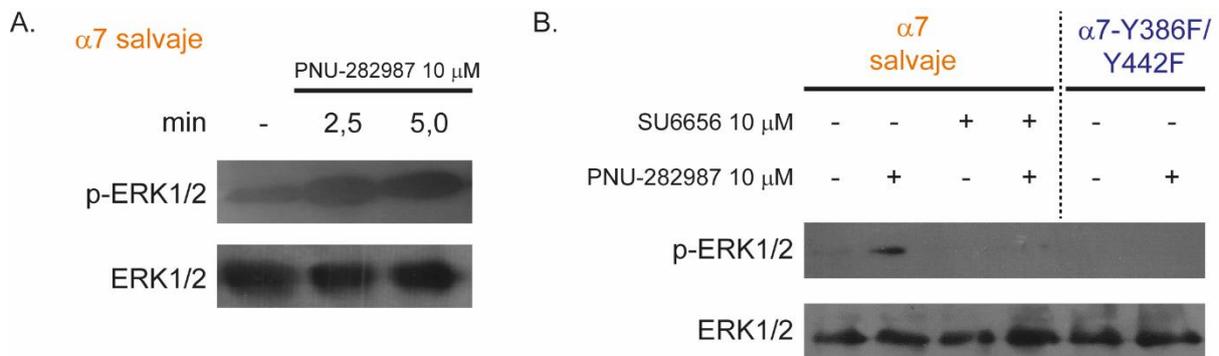


FIGURA I.9. Efecto de la fosforilación en la vía de ERK 1/2 disparada por activación de $\alpha 7$.

(A) *Western blot* de p-ERK 1/2 después de la exposición de las células BOSC23 que expresan $\alpha 7$ salvaje a PNU-282987 10 μ M durante 0; 2,5 o 5 minutos.

(B) *Western blot* de p-ERK 1/2 tras la activación de $\alpha 7$ salvaje (izquierda) o $\alpha 7$ -Y386F/Y442F (derecha) con un pulso de PNU-282987 10 μ M por 5 minutos. Las células expresando $\alpha 7$ salvaje (izquierda) fueron preincubadas por 30 minutos con SU6656 10 μ M o con su vehículo (control).

Por lo tanto, es posible concluir que la inhibición de las SFK o la ausencia de Tyr fosforilables en el ICD de $\alpha 7$ impiden la activación de la vía de ERK 1/2 que se dispara tras la activación del receptor.

2. Efecto de la fosforilación/desfosforilación de Ser/Thr en el ICD de $\alpha 7$ sobre la función del receptor

Utilizando el programa NetPhos 3.1, se realizó un análisis del ICD de $\alpha 7$ en búsqueda de potenciales sitios de fosforilación en residuos Ser y Thr. El reporte del programa señaló que seis de las ocho Ser presentes en el ICD son potencialmente fosforilables, pero solo dos, la Ser-365 y la Ser-368 tienen un valor alto de predicción (> 0,95). En cuanto a las Thr, los tres residuos presentes en el ICD podrían fosforilarse, pero el puntaje que arroja el programa es bajo en todos los casos, siendo la Thr 331 la que mayor probabilidad tiene con un valor de 0,639. Entre las quinasas, la PKA y la PKC son buenos candidatos para fosforilar los tres sitios: Thr-331, Ser-365 y Ser-368.

Por ello, en esta segunda parte del capítulo, se decidió trabajar con inhibidores y activadores de estas quinasas para evaluar cambios en las propiedades de canal único del receptor $\alpha 7$ salvaje. Además, en paralelo se diseñaron por mutagénesis dirigida tres receptores mutantes que carecen de estos potenciales sitios de fosforilación por reemplazo del residuo correspondiente por alanina: $\alpha 7$ -T331A, $\alpha 7$ -S365A y $\alpha 7$ -S368A. Dos trabajos previos señalan a la Ser-365 como un sitio de fosforilación por PKA (Komal et al., 2015; Moss et al., 1996), por lo que se decidió también generar un mutante que posea un Asp en lugar de la Ser ($\alpha 7$ -S365D) simulando un estado fosforilado permanente (fosfomimético).

2.1. Efectos de la activación e inhibición de PKA en la duración y frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$

Con el objetivo de determinar si la fosforilación por PKA de Ser y Thr en el ICD de $\alpha 7$ afecta su actividad ionotrópica a nivel de corrientes unitarias, se utilizaron drogas para activar o inhibir a dicha quinasas mediante dos estrategias diferentes: (i) pretratamiento, o (ii) agregado durante el transcurso del registro. Como activador de PKA se utilizó 8-Br-cAMP, y como inhibidor se empleó KT-5720.

En primer lugar, se incubaron las células BOSC23 expresando el receptor salvaje durante 30 minutos con 8-Br-cAMP 100 μ M. Luego de este tiempo se realizaron registros de canal único por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* utilizando ACh 100 μ M en la pipeta como agonista. El análisis de los registros y la construcción de los histogramas reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas en la duración media de los episodios de activación aislados y de los *bursts* entre las células tratadas con DMSO 0,1 %v/v ($\tau_{open} = 0,32 \pm 0,07$ ms; $\tau_{burst} = 0,48 \pm 0,13$ ms; n = 17; N = 4) y las tratadas con el activador de PKA ($\tau_{open} = 0,30 \pm 0,10$ ms; p = 0,778; $\tau_{burst} = 0,42 \pm 0,16$ ms; p = 0,317; n = 10; N = 4; Figura I.10).

En otra serie de experimentos se generó la condición inversa por tratamiento de las células durante 30 minutos con el inhibidor de PKA (KT-5720 200 nM). Los registros de canal único no mostraron tampoco diferencias estadísticamente significativas en la duración media de las aperturas aisladas y de los *bursts* ($\tau_{open} = 0,29 \pm 0,08$ ms; p = 0,484; $\tau_{burst} = 0,41 \pm 0,12$ ms; p = 0,393; n = 4; N = 2) con respecto a las células no tratadas (Figura I.10).

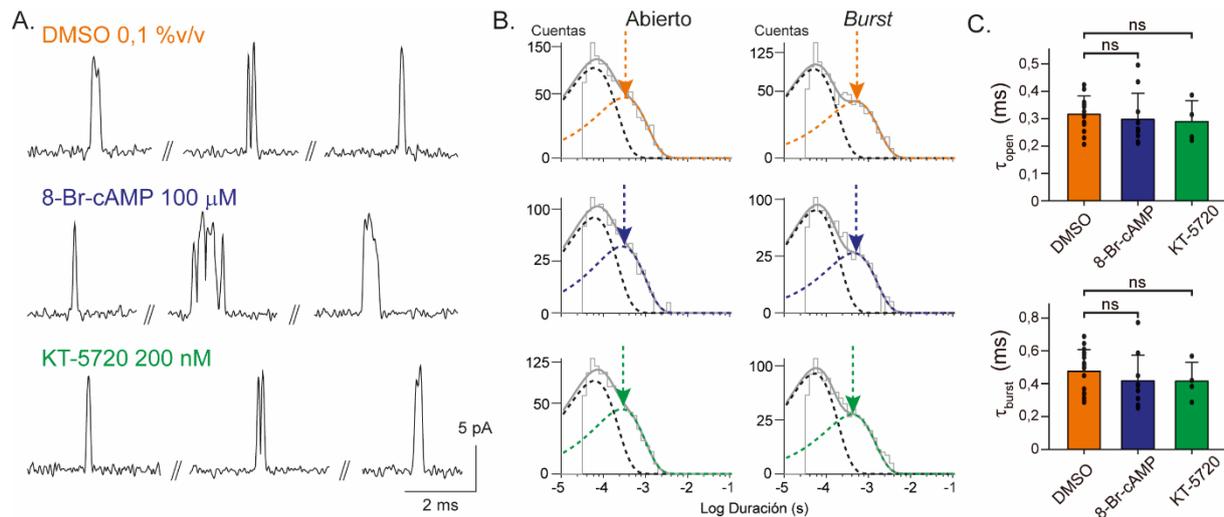


FIGURA I.10. Efecto de la activación e inhibición de PKA en el perfil cinético de $\alpha 7$ a nivel de canal único.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM en células incubadas con DMSO (arriba), 8-Br-cAMP (medio) o KT-5720 (abajo). Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos señalados con las flechas.

(C) Gráficos de barras de las duraciones de los componentes más lentos del histograma de estado abierto (τ_{open}) y de *bursts* (τ_{burst}) para cada condición. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 17$; $N = 4$ para DMSO; $n = 10$; $N = 4$ para 8-Br-cAMP; y $n = 4$; $N = 2$ para KT-5720). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones con DMSO (control) y las condiciones con 8-Br-cAMP o KT-5720 (ns: no significativo, $p \geq 0,05$).

Los experimentos anteriores no brindan información acerca de los cambios en el nivel de actividad de $\alpha 7$ por acción del activador o inhibidor de PKA debido a que el registro de los canales se lleva a cabo luego del tratamiento con la droga. Por ello, para evaluar si la modificación de la actividad de PKA afecta a la frecuencia de los episodios de activación disparados por ACh, se utilizó un protocolo similar al empleado con PP2 (Figura I.3A). En células sin incubar previamente, luego de logrado el sello, se registró la actividad de $\alpha 7$, activado por ACh 100 μM presente en la pipeta, durante un tiempo suficiente para contar con 700-1000 eventos. A continuación, se agregó 8-Br-cAMP a la ECS de la cápsula para lograr una concentración final 100 μM del activador. Finalmente, se continuó registrando la actividad del canal durante un tiempo similar al de antes de agregar la droga. En estos registros se cuantificó la frecuencia de los episodios de activación y la nP_o , antes y después del agregado de 8-Br-cAMP, y se expresó como la

relación después/antes. Ninguno de los dos parámetros mostró diferencias estadísticamente significativas tras el agregado de 8-Br-cAMP en comparación al agregado de DMSO (relación después/antes = $0,88 \pm 0,08$; $p = 0,120$ para la frecuencia de los episodios de activación; y relación después/antes = $0,82 \pm 0,09$; $p = 0,418$ para la nP_o ; $n = 3$; $N = 1$). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros cinéticos luego del agregado del activador de PKA (relación después/antes = $0,97 \pm 0,08$; $p = 0,842$ para la τ_{open} ; y relación después/antes = $0,99 \pm 0,10$; $p = 0,985$ para la τ_{burst} ; $n = 3$; $N = 1$; Figura I.11).

Por otro lado, también se llevó a cabo el experimento opuesto, es decir, el mismo protocolo de agregado de la droga durante el transcurso del registro, pero con el inhibidor de PKA (KT-5720 200 nM). En este caso, ambos parámetros relacionados con el nivel de actividad del canal se vieron incrementados significativamente tras el agregado de KT-5720 en comparación al agregado de DMSO (relación después/antes = $1,23 \pm 0,36$; $p = 0,003$ para la frecuencia de los episodios de activación; y relación después/antes = $1,24 \pm 0,42$; $p = 0,002$ para la nP_o ; $n = 12$; $N = 3$). En cambio, los parámetros cinéticos no se vieron modificados tras la inhibición de PKA por KT-5720 durante el transcurso del registro (relación después/antes = $1,01 \pm 0,13$; $p = 0,751$ para la τ_{open} ; y relación después/antes = $1,08 \pm 0,15$; $p = 0,116$ para la τ_{burst} ; $n = 12$; $N = 3$; Figura I.11).

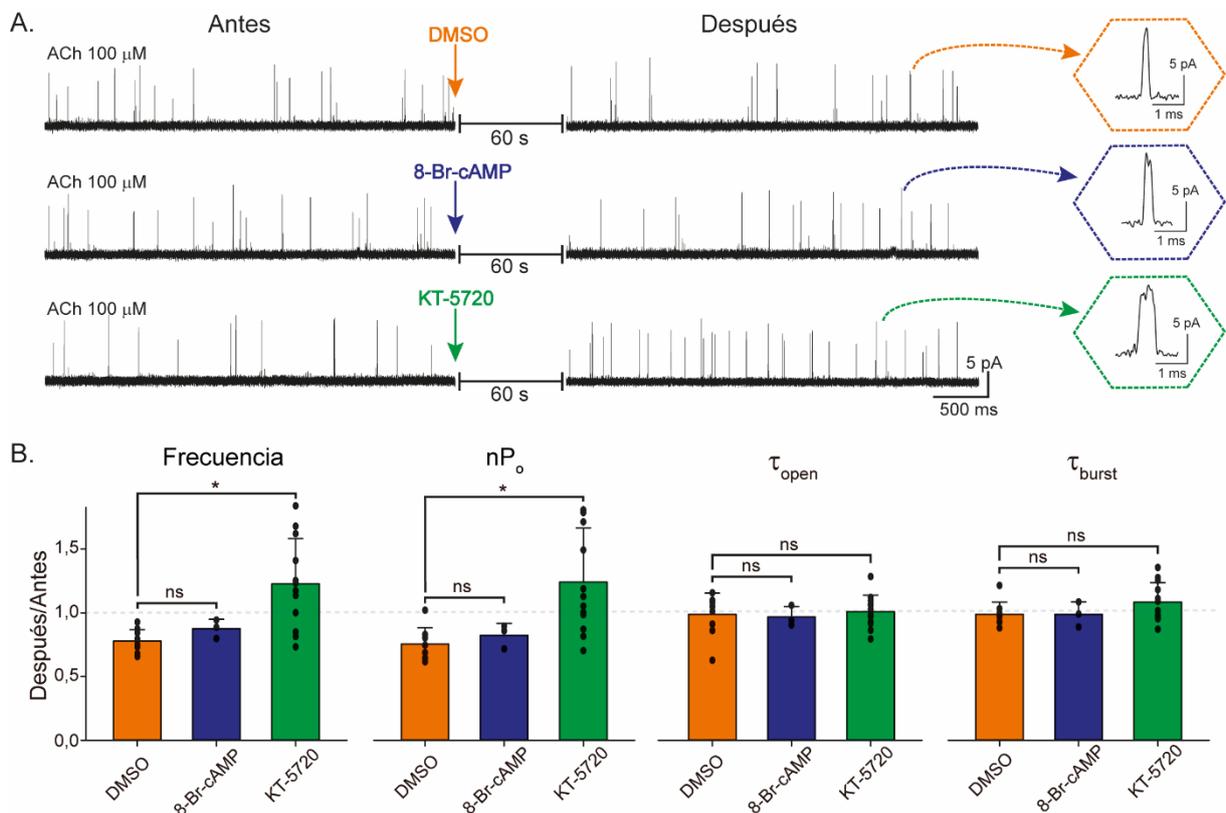


FIGURA I.11. Efectos de la activación e inhibición de PKA en la frecuencia y duración de los episodios de activación de $\alpha 7$ a nivel de canal único.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de DMSO 0,1 %v/v (arriba), 8-Br-cAMP 100 μM (medio) o KT-5720 200 nM (abajo). En los recuadros se muestran con mayor amplificación los eventos típicos después del agregado de DMSO, 8-Br-cAMP o KT-5720. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráficos de barras que muestran las relaciones después/antes en la frecuencia de los episodios de activación, nP_o , τ_{open} y τ_{burst} debido a la adición de DMSO, 8-Br-cAMP o KT-5720. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: DMSO (n = 9; N = 6), 8-Br-cAMP (n = 3; N = 1) y KT-5720 (n = 12; N = 3). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones con DMSO (control) y las condiciones con 8-Br-cAMP o KT-5720 (ns: no significativo, $p \geq 0,05$; el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,05^*$).

En conclusión, en este sistema de expresión heterólogo, se demostró que la duración de los episodios de activación de $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias no se altera ante cambios en el nivel de actividad de PKA, pero la frecuencia de dichos episodios se ve incrementada cuando se favorece un estado desfosforilado del receptor por inhibición de la actividad de la quinasa. Estos resultados recapitulan el aumento de frecuencia debido a la inhibición de las SFK, pero difieren en la ausencia de efecto sobre la duración media de los *bursts* que se observa por desfosforilación de Tyr.

2.2. Efectos de la activación e inhibición de PKC en la duración y frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$

Para determinar si la fosforilación por PKC de Ser y Thr en el ICD de $\alpha 7$ afecta su actividad ionotrópica a nivel de canal único, se trabajó de forma similar a la anteriormente descrita para PKA. En este caso, el activador de PKC utilizado fue el PMA; y el inhibidor fue el Gö-6983.

Las células expresando el receptor $\alpha 7$ fueron incubadas por 30 minutos con PMA 1 μM . A continuación, se realizaron registros de canal único por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* utilizando ACh 100 μM en la pipeta como agonista. El análisis de los registros reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas en las duraciones medias de las aperturas aisladas y de los *bursts* entre las células tratadas con DMSO 0,1 %v/v ($\tau_{open} = 0,32 \pm 0,07$ ms; $\tau_{burst} = 0,48 \pm 0,13$ ms; n = 17; N = 4) y las

tratadas con el activador de PKC ($\tau_{open} = 0,26 \pm 0,02$ ms; $p = 0,179$; $\tau_{burst} = 0,36 \pm 0,05$ ms; $p = 0,160$; $n = 3$; $N = 1$; Figura I.12).

La condición opuesta, donde se inhibe la PKC, también fue ensayada. Luego del tratamiento de las células durante 30 minutos con Gö-6983 1 μ M, se realizaron los registros de canal único con ACh 100 μ M para activar a $\alpha 7$. En este caso, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en las duraciones medias de las aperturas aisladas y de los *bursts* ($\tau_{open} = 0,24 \pm 0,05$ ms; $p = 0,0999$; $\tau_{burst} = 0,37 \pm 0,09$ ms; $p = 0,181$; $n = 3$; $N = 1$) con respecto a las células tratadas con DMSO (Figura I.12).

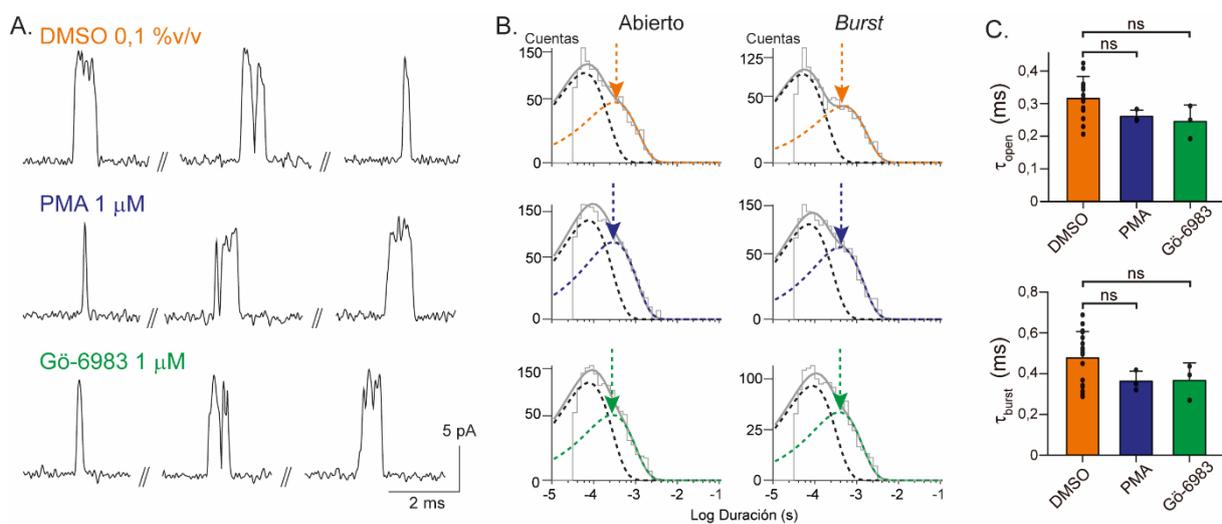


FIGURA I.12. Efecto de la activación e inhibición de PKC en el perfil cinético de $\alpha 7$ a nivel de canal único.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μ M en células incubadas con DMSO (arriba), PMA (medio) o Gö-6983 (abajo). Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos señalados con las flechas.

(C) Gráficos de barras de las duraciones de los componentes más lentos del histograma de estado abierto (τ_{open}) y de *bursts* (τ_{burst}) para cada condición. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 17$; $N = 4$ para DMSO; $n = 3$; $N = 1$ para PMA; y $n = 3$; $N = 1$ para Gö-6983). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones con DMSO (control) y las condiciones con PMA o Gö-6983 (ns: no significativo, $p \geq 0,05$).

Por otro lado, para evaluar si la modificación de la actividad de PKC durante el transcurso de un registro afecta a la frecuencia de los episodios de activación, se utilizó el

protocolo donde se adiciona la droga durante el transcurso del registro, tal como se explicó previamente para los experimentos con PP2, 8-Br-cAMP y KT-5720. En primera instancia se registró la actividad basal de $\alpha 7$, y luego se agregó el activador de PKC (PMA 1 μM) a la cápsula para, finalmente, continuar registrando la actividad del canal. Se cuantificó la frecuencia de los episodios de activación y la nP_o , antes y después del agregado de PMA, y se expresó como la relación después/antes. Ninguno de los dos parámetros mostró diferencias estadísticamente significativas tras el agregado del activador en comparación al agregado de DMSO (relación después/antes = $0,88 \pm 0,02$; $p = 0,076$ para la frecuencia de los episodios de activación; y relación después/antes = $0,82 \pm 0,06$; $p = 0,329$ para la nP_o ; $n = 4$; $N = 1$). De la misma manera, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros cinéticos por el agregado PMA (relación después/antes = $1,02 \pm 0,08$; $p = 0,679$ para la τ_{open} ; y relación después/antes = $0,99 \pm 0,12$; $p = 0,946$ para la τ_{burst} ; $n = 4$; $N = 1$; Figura I.13).

Por último, se llevó a cabo el experimento opuesto, donde se agrega el inhibidor de PKC en el transcurso del registro de $\alpha 7$. En este caso, ninguno de los cuatro parámetros medidos mostró diferencias estadísticamente significativas tras el agregado de Gö-6983 1 μM en comparación con la adición de DMSO (relación después/antes = $0,88 \pm 0,08$; $p = 0,106$ para la frecuencia de los episodios de activación; relación después/antes = $0,84 \pm 0,14$; $p = 0,349$ para la nP_o ; relación después/antes = $0,91 \pm 0,02$; $p = 0,471$ para la τ_{open} ; y relación después/antes = $0,96 \pm 0,8$; $p = 0,692$ para la τ_{burst} ; $n = 3$; $N = 1$; Figura I.13).

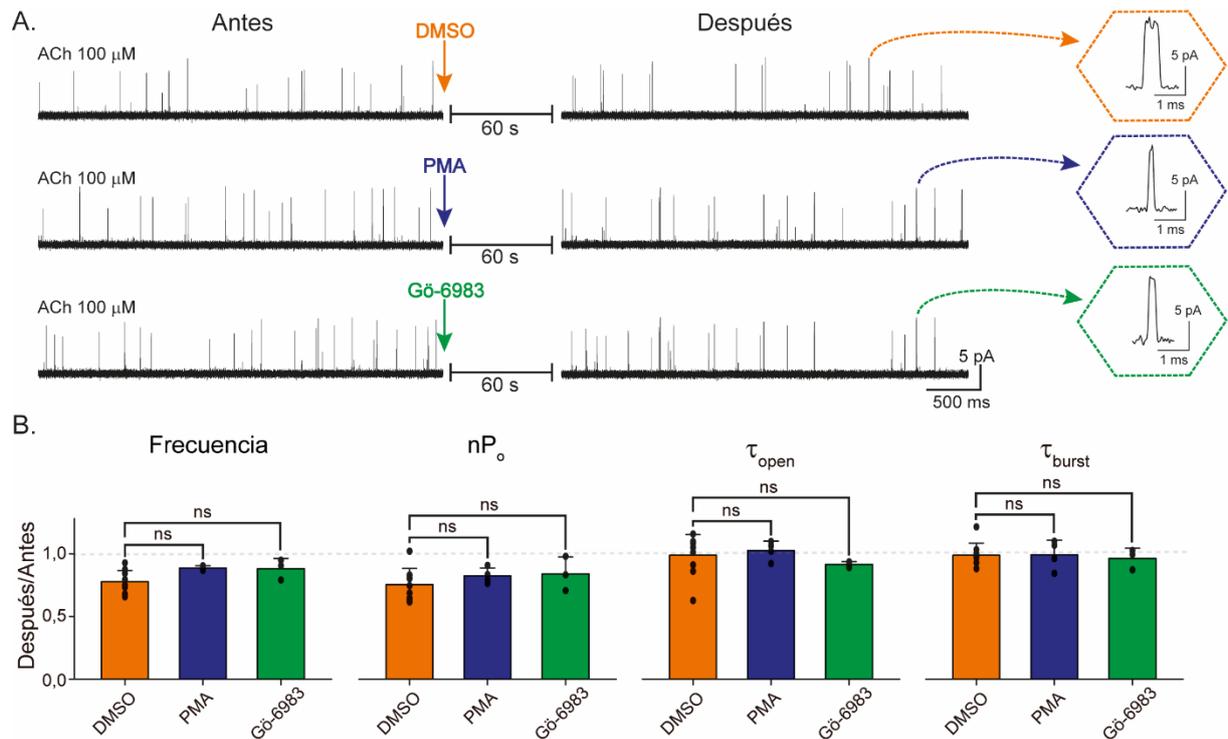


FIGURA I.13. Efectos de la activación e inhibición de PKC en la frecuencia y duración de los episodios de activación de $\alpha 7$ a nivel de canal único.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de DMSO 0,1 %v/v (arriba), PMA 1 μM (medio) o Gö-6983 1 μM (abajo). En los recuadros se muestran con mayor amplificación los eventos típicos después del agregado de DMSO, PMA o Gö-6983. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráficos de barras que muestran las relaciones después/antes en la frecuencia de los episodios de activación, nP_o , τ_{open} y τ_{burst} debido a la adición de DMSO, PMA o Gö-6983. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: DMSO ($n = 9$; $N = 6$), PMA ($n = 4$; $N = 1$) y Gö-6983 ($n = 3$; $N = 1$). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones con DMSO (control) y las condiciones con 8-Br-cAMP o KT-5720 (ns: no significativo, $p \geq 0,05$)

Evaluando los resultados obtenidos, se puede concluir que la modificación del grado de actividad de PKC por el uso de activadores e inhibidores de la quinasa no tiene efecto alguno en la duración y frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ salvaje expresado de forma heteróloga en células BOSC23.

2.3. Los mutantes de $\alpha 7$ en Ser y Thr potencialmente fosforilables tienen el mismo perfil cinético que el receptor salvaje

Cada uno de los cuatro mutantes generados ($\alpha 7$ -T331A, $\alpha 7$ -S365A, $\alpha 7$ -S368A y $\alpha 7$ -S365D) fue expresado en células BOSC23 para luego poder evaluar sus propiedades cinéticas (τ_{open} y τ_{burst}) a nivel de canal único mediante la realización de registros de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* con ACh 100 μ M como agonista en la pipeta. Los cuatro mutantes expresaron bien en las células, y los registros de corrientes unitarias fueron similares a los del receptor salvaje, es decir, la actividad del canal en cada uno de ellos se evidenció principalmente en la forma de aperturas breves y aisladas, y en menor medida como episodios de activación sostenidos (*bursts*) de corta duración. La construcción de los histogramas de estado abierto y de *bursts* permitió demostrar que no existen diferencias estadísticamente significativas en ambos parámetros cinéticos entre cada uno de los cuatro receptores mutantes y el receptor salvaje (Tabla I.1).

| Receptor | τ_{open} (ms) | p | τ_{burst} (ms) | p | n/N |
|--------------------|--------------------|------------|---------------------|------------|-------|
| $\alpha 7$ salvaje | 0,30 \pm 0,06 | - | 0,46 \pm 0,12 | - | 38/12 |
| $\alpha 7$ -T331A | 0,30 \pm 0,08 | 0,742 (ns) | 0,46 \pm 0,13 | 0,985 (ns) | 6/3 |
| $\alpha 7$ -S365A | 0,29 \pm 0,03 | 0,620 (ns) | 0,42 \pm 0,09 | 0,383 (ns) | 6/4 |
| $\alpha 7$ -S368A | 0,25 \pm 0,03 | 0,0831(ns) | 0,38 \pm 0,08 | 0,216 (ns) | 4/2 |
| $\alpha 7$ -S365D | 0,28 \pm 0,06 | 0,530 (ns) | 0,39 \pm 0,08 | 0,250 (ns) | 4/2 |

TABLA I.1. Parámetros cinéticos de los receptores $\alpha 7$ salvaje y mutantes en Ser y Thr.

Se indican las duraciones medias de las aperturas aisladas (τ_{open}) y de los *bursts* (τ_{burst}) obtenidas de los histogramas correspondientes. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. “n” indica el número de registros distintos; “N” indica el número de transfecciones diferentes. “p” corresponde al valor de p resultante de la prueba t-Student a dos colas entre el receptor salvaje (control) y cada uno de los mutantes (ns: no significativo, $p \geq 0,05$).

DISCUSIÓN

La importancia de comprender cómo la fosforilación altera la función de los pLGIC está respaldada por su asociación con estados patológicos. La fosforilación inapropiada de estos receptores tiene consecuencias patológicas y, por lo tanto, se ha postulado que la modulación de este proceso puede ser una vía para nuevas estrategias terapéuticas (Lee et al., 2015; Talwar y Lynch, 2014). Por ejemplo, la fosforilación de los GlyR $\alpha 3$ mediada por la PKA en las neuronas sensoriales espinales está asociada con el dolor crónico (Acuña et al., 2016; Harvey et al., 2014). La fosforilación de los GABA_AR se relaciona con el estado epiléptico, el alcoholismo y los déficits de memoria espacial (Talwar y Lynch, 2014). El déficit en la expresión funcional de los GABA_AR, que caracteriza al estado epiléptico, es consecuencia de una disminución en la fosforilación de la subunidad $\beta 3$ del receptor (Terunuma et al., 2008). En los nAChR, se ha informado que la fosforilación de los receptores de tipo muscular, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ es relevante para los trastornos musculares, la adicción a la nicotina y la fertilización, respectivamente (Biaggi-Labiosa et al., 2015; Kumar y Meizel, 2005; Talwar y Lynch, 2014).

Por otra parte, $\alpha 7$ está involucrado en diferentes situaciones patológicas en las que se ha descrito una fosforilación aberrante, incluida la enfermedad de Alzheimer, los trastornos inflamatorios y respiratorios y el cáncer (Aschner y Downey, 2018; Hendriks et al., 2013; Mallozzi et al., 2020; Perluigi et al., 2016). Además, el aumento de la actividad de $\alpha 7$ mejora la cognición y la memoria, favorece la potenciación a largo plazo y tiene efectos neuroprotectores y antiinflamatorios (Corradi y Bouzat, 2016a; Dineley et al., 2015; Uteshev, 2014), todos procesos en los que están involucrados eventos de fosforilación. Por lo tanto, una mayor exploración del impacto directo del estado de fosforilación de $\alpha 7$ en estas situaciones fisiológicas y patológicas es relevante para definir nuevas estrategias terapéuticas.

Analizados en conjunto, los resultados expuestos en la primera parte de este capítulo muestran que favorecer el estado desfosforilado de las Tyr de $\alpha 7$ potencia la actividad ionotrópica del receptor por un mecanismo que involucra un aumento en la frecuencia y duración de los episodios de activación, junto a una disminución en la velocidad de desensibilización y a un aumento en la tasa de recuperación desde el estado desensibilizado. Por el contrario, la desfosforilación de las Tyr tiene un efecto negativo en la actividad metabotrópica del receptor, estudiada a partir de la vía de ERK 1/2.

Una serie de trabajos previos utilizando registros de corrientes macroscópicas han demostrado que la fosforilación de Tyr de $\alpha 7$ disminuye las respuestas máximas provocadas por el agonista, mientras que la desfosforilación produce el efecto contrario (Charpantier et al., 2005; Cho et al., 2005). La explicación del aumento de las corrientes de $\alpha 7$ tras la desfosforilación es discrepante entre ambos trabajos, ya que por un lado el efecto fue atribuido a un mayor número de receptores en la superficie (Cho et al., 2005), y por el otro, a cambios directos en la función del receptor (Charpantier et al., 2005). Las corrientes macroscópicas no pueden proporcionar información sobre el mecanismo que subyace a dicho efecto, ya que sus amplitudes dependen de la amplitud de cada canal individual, del número de canales en la célula y de la probabilidad de apertura del canal. Los resultados presentados en este capítulo, utilizando principalmente el enfoque a nivel de canal único de alta resolución, permitieron confirmar que la fosforilación de Tyr afecta directamente a los estados conformacionales del receptor. En particular, el aumento en la duración media de los *bursts*, observada al favorecer un estado desfosforilado del receptor, no puede explicarse por un cambio en el número de canales en membrana, lo que indica claramente un efecto directo sobre la cinética del receptor. Es decir, este resultado es una evidencia que concuerda con el argumento de que la fosforilación afecta directamente la función del receptor (Charpantier et al., 2005), más que al número de canales en membrana (Cho et al., 2005). Sin embargo, es importante resaltar que el diseño experimental utilizado en este capítulo no puede descartar que existan pequeños cambios en el número de receptores en la membrana tras el tratamiento con las distintas drogas a lo largo del registro. El incremento en la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ luego de la inhibición de las SFK por el agregado de PP2 (Figura I.3) podría explicarse por un aumento transitorio en el número de canales insertos en la membrana que suceda de forma relativamente rápida tras la adición de la droga. Sin embargo, la explicación más probable del aumento de este parámetro es que el receptor desfosforilado se recupera más rápido desde el estado desensibilizado y, por ende, tras la adición del PP2 hay más canales cerrados en reposo disponibles para abrirse, lo que se ve reflejado en una mayor frecuencia de aparición de eventos de apertura. Esta última hipótesis es fuertemente respaldada por los resultados obtenidos en corrientes macroscópicas a partir del protocolo de pulso doble pareado, en donde el mutante $\alpha 7$ -Y386F/Y442F evidenció una velocidad de recuperación de la desensibilización significativamente mayor que el receptor salvaje (Figura I.8A y B). Tampoco debe descartarse que puedan ocurrir ambos

efectos y que, según el tipo celular y el contexto en el que se estudie, prevalezca uno sobre el otro, lo que explicaría las discrepancias que aparecen en la bibliografía.

Como se comentó previamente, la falta de residuos Tyr en el ICD de $\alpha 7$ aumenta la duración de los *bursts* del receptor (Figura I.5). El mismo resultado fue obtenido al inhibir a las PTK de la familia de Src (Figura I.2) que, al no poder fosforilar al receptor, favorece el balance hacia un estado desfosforilado del mismo. Teniendo en cuenta que en $\alpha 7$ la duración del estado abierto es gobernada por la desensibilización (Bouzat et al., 2008), el incremento en la duración de los *bursts* podría ser el resultado de una reducción en la velocidad de desensibilización. Los resultados presentados en este capítulo permitieron poner de manifiesto que las corrientes macroscópicas del receptor mutante $\alpha 7$ -Y386F/Y442F decaen más lentamente en presencia de agonista que las corrientes de los receptores de tipo salvaje (Figura I.8C). Aunque en $\alpha 7$ la tasa de decaimiento de las corrientes obtenidas en la configuración *whole-cell* no refleja exactamente la velocidad de desensibilización, debido a limitantes en la resolución temporal del sistema (Bouzat et al., 2008; Bouzat y Sine, 2018), la comparación de la constante de decaimiento en condiciones idénticas sugiere que el receptor no fosforilado tiene una transición más lenta desde el estado abierto hacia el estado desensibilizado en comparación con el receptor salvaje.

Los trabajos que demostraron por primera vez que las respuestas macroscópicas máximas de $\alpha 7$ se ven reducidas por la fosforilación de Tyr del receptor (Charpantier et al., 2005; Cho et al., 2005), consideran que otro de los parámetros que podría explicar este efecto es una disminución en la conductancia unitaria del canal. En uno de estos estudios, los autores descartan esta explicación por considerarla poco probable (Cho et al., 2005), mientras que en el otro dejan abierta la posibilidad indicando que no poseen las técnicas necesarias para medir este parámetro (Charpantier et al., 2005). En un trabajo más reciente, se demostró nuevamente que la fosforilación de Tyr de $\alpha 7$ reduce las respuestas macroscópicas del receptor nativo en cerebro de ratón por un mecanismo que implica una reducción del número de receptores en membrana y una disminución en la conductancia unitaria de los canales (Komal et al., 2014). Los autores de dicho estudio aplican el análisis de fluctuación de corriente iónica a partir de corrientes macroscópicas para estimar la conductancia unitaria de los canales $\alpha 7$. Este hallazgo no concuerda con los resultados expuestos en este capítulo donde los registros de corrientes unitarias de $\alpha 7$ no mostraron cambios en la amplitud del canal tras el tratamiento con pervanadato, que al inhibir las PTP favorece un estado fosforilado del receptor (Figura I.4D). Además,

tampoco se encontraron diferencias de amplitud en los canales del receptor $\alpha 7$ -Y386F/Y442F en comparación con los del receptor salvaje (Figura I.5B). La explicación de esta discrepancia puede residir en las diferencias metodológicas para medir la conductancia unitaria, ya que la estimación de este parámetro por el análisis de fluctuación de corriente iónica no es tan precisa como la medición de la amplitud de los canales obtenidos a partir de registros de canal único de alta resolución. Por otro lado, también hay que tener en cuenta que existen diferencias en el tipo de receptor (de ratón y humano), en la forma de expresión (nativa y heteróloga), y en el modo de incrementar el estado de fosforilación (activación indirecta de las SFK e inhibición de fosfatasa o sustitución de Tyr en el ICD) entre dicho trabajo y el presente capítulo respectivamente. Una evidencia que está en línea con los resultados aquí expuestos proviene de uno de los estudios pioneros sobre el efecto de la fosforilación en la actividad del nAChR muscular, donde se demostró que la amplitud de los canales del receptor reconstituido en liposomas, medida a partir de registros de canal único, no se ve modificada por el aumento en la fosforilación de Tyr del receptor (Hopfield et al., 1988).

Solo hay dos residuos de Tyr en el ICD de $\alpha 7$, la Tyr-386 se ubica en el medio del ICD, y la Tyr-442 lo hace antes del comienzo de la hélice MA. Mientras que el primer residuo no se conserva entre las subunidades de los nAChR, el segundo si lo hace en $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\beta 1$. Los nAChR musculares son fosforilados por PTK en las subunidades $\beta 1$, γ y δ (Huganir et al., 1984; Talwar y Lynch, 2014; Wagner et al., 1991); y la fosforilación de las Tyr es de gran relevancia en la formación de la NMJ y en la agrupación de los receptores (Wiesner y Fuhrer, 2006). Además, desde el punto de vista funcional, la fosforilación de las Tyr se ha correlacionado con una mayor velocidad de desensibilización del receptor muscular (Hopfield et al., 1988; Swope et al., 1992). Con respecto a los nAChR $\alpha 4\beta 2$ neuronales, un estudio reportó que la fosforilación de las Tyr puede afectar negativamente la función del receptor (Biaggi-Labiosa et al., 2015). En este trabajo, la sustitución de la Tyr-576 de $\alpha 4$ por una alanina lleva a un aumento en las corrientes máximas del receptor, mientras que el cambio por un ácido aspártico (fosfomimético) produce una disminución de esas corrientes. Estos efectos de la fosforilación de Tyr en los nAChR muscular y $\alpha 4\beta 2$ concuerdan con los reportados sobre el receptor $\alpha 7$, tanto en este capítulo de tesis como en la bibliografía previamente mencionada. Sin embargo, un efecto totalmente opuesto fue informado en un estudio sobre el nAChR $\alpha 3\beta 4\alpha 5$, donde se demostró que las corrientes macroscópicas del receptor se ven incrementadas tras el tratamiento con

pervanadato o por coexpresión con una Src activa, y se ven reducidas por acción del PP2 o la coexpresión de una Src inactiva (K. Wang et al., 2004). Por lo tanto, se puede concluir que las PTK proporcionan los medios para regular todos los nAChR, pero las consecuencias funcionales, incluso las causadas por la misma familia de quinasas, son específicas para cada subtipo de receptor y ubicación.

Además de la acción ionotrópica canónica de $\alpha 7$, que provoca una rápida despolarización y aumento del Ca^{2+} intracelular, la activación del receptor dispara diversas vías de señalización intracelular. Estas acciones son de gran importancia para las actividades neuroprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias de $\alpha 7$, y tienen lugar en una escala temporal diferente al flujo rápido de iones. En este capítulo también se evaluó el efecto de la fosforilación de las Tyr sobre la función metabotrópica de $\alpha 7$ estudiada a partir de la vía de ERK 1/2, que está asociada con la neuroprotección y la proliferación celular inducidas por la nicotina (Elnagar et al., 2018; Larsen et al., 2019; Nishioka et al., 2019; Toborek et al., 2007).

Inicialmente, se demostró que los niveles de p-ERK 1/2 se vieron notablemente aumentados tras una breve exposición de células BOSC23 que expresan $\alpha 7$ al agonista específico PNU-282987 (Figura I.9A), lo que concuerda con resultados publicados en varios trabajos con distintos tipos celulares que expresan $\alpha 7$ (Gubbins et al., 2010; Kouhen et al., 2009; Toborek et al., 2007). Este incremento en el nivel de p-ERK 1/2 se eliminó por completo tras una incubación de las células con un inhibidor de las SFK (Figura I.9B), lo que indica que estas quinasas son fundamentales en la vía. Una posibilidad es que las SFK sean uno de los eslabones que conectan $\alpha 7$ a ERK 1/2, es decir, que alguna de estas quinasas se encuentre río abajo de la activación del nAChR. Otra posible explicación, que surge al considerar que el mutante $\alpha 7$ -Y386F/Y442F expresado en células BOSC23 fue incapaz de activar la vía de ERK 1/2 (Figura I.9B), es que $\alpha 7$ debe tener sus Tyr en el ICD fosforiladas por acción de las SFK para poder disparar la vía que termina en p-ERK 1/2 tras su activación. Hay evidencias de que ciertas SFK (Fyn y Lck), tras ser activadas río abajo del receptor de linfocitos T, fosforilan a $\alpha 7$ llevando a una reducción de las corrientes macroscópicas en neuronas corticales de ratón (Komal et al., 2014).

Un aspecto importante a dilucidar es qué gobierna el estado fosforilado de $\alpha 7$ y cómo las SFK regulan la señalización de $\alpha 7$ hacia la fosforilación de ERK 1/2. Una posibilidad es que exista una asociación directa entre $\alpha 7$ y algún miembro de las SFK. Esta

teoría está respaldada por un estudio *in silico* que muestra sitios de unión para proteínas con dominios SH2 y SH3 en el ICD de $\alpha 7$ (Stokes et al., 2015), que pueden ser reconocidos por las SFK; y también por un trabajo en cultivos primarios de corteza de rata donde se demostró una interacción directa entre $\alpha 7$ y Fyn (Kihara et al., 2001). Otra evidencia más indirecta surge de una publicación que muestra la unión de Src a proteínas de fusión que contienen la mitad N-terminal del ICD de la subunidad $\beta 1$ de los nAChR (Fuhrer y Hall, 1996), y sugiere que la asociación de Src a $\beta 1$ lleva a la fosforilación de la subunidad creando un sitio de unión para Fyn, evento fundamental para el agrupamiento de los nAChR musculares durante el desarrollo de la NMJ. Tampoco hay que descartar que es posible que se requiera la activación de $\alpha 7$ por el agonista para producir un cambio conformacional en el ICD que exponga los residuos de Tyr para que ocurra la fosforilación mediada por las SFK, lo que conduce finalmente al aumento de p-ERK 1/2.

La existencia de un *cross-talk* entre $\alpha 7$ y otros receptores (Komal et al., 2014; Nishioka et al., 2019; Pestana et al., 2005); la participación de proteínas adaptadoras, como es el caso de Grb2 que se asocia a una Tyr fosforilada de la subunidad δ del nAChR muscular (Colledge y Froehner, 1997); y la activación de las SFK por otros mediadores desencadenados por el influjo de Ca^{2+} inducido por $\alpha 7$, también pueden tener lugar. Lo más probable es que se produzcan diferentes acciones dependiendo del contexto celular y de las proteínas de andamiaje presentes en el microdominio del receptor, lo cual puede resultar en la activación de diferentes vías de señalización intracelular y en el movimiento del Ca^{2+} iniciado por la unión del agonista a $\alpha 7$. A futuro sería interesante analizar si otras vías de señalización activadas por $\alpha 7$ también requieren la fosforilación de las Tyr del ICD.

Los resultados obtenidos en la segunda parte de este capítulo permiten concluir que, a diferencia de lo que sucede con las Tyr, la alteración del estado de fosforilación de las Ser y Thr del ICD de $\alpha 7$, al menos en las condiciones experimentales aquí utilizadas, tiene poca influencia en la actividad ionotrópica del receptor, ya que el único efecto observado fue un aumento leve en los episodios de activación tras la inhibición específica de la PKA. La ausencia de efecto al activar e inhibir PKC podría ser consecuencia de la falta de expresión de dicha quinasa en la línea celular aquí empleada. Si bien este hecho no fue probado experimentalmente en este capítulo, resulta poco probable considerando que existen muchos trabajos que utilizan las mismas células y que han demostrado la expresión de la quinasa o la aparición de algún efecto relacionado con su activación o inhibición específica (Acharya y Kim, 2019; Eilers et al., 1997; F. Xu et al., 2003).

Las duraciones de los episodios de activación del receptor, tanto aislados como sostenidos, no se modificaron tras la activación o inhibición de la PKA o la PKC, ya sea por una incubación previa o por el agregado de la droga durante el registro. De la misma manera, tampoco se encontraron diferencias en los parámetros cinéticos entre los distintos mutantes de Ser y Thr ensayados y el receptor salvaje. El único cambio registrado fue un leve aumento en la frecuencia de los episodios de activación del receptor tras la inhibición específica de la PKA. Estos resultados concuerdan con los de un trabajo que muestra que, si bien la activación de PKA conlleva a una reducción de las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$, el efecto no es atribuible a cambios en las propiedades funcionales intrínsecas del canal sino a una disminución del número de receptores en membrana (Komal et al., 2015). El leve incremento en la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ luego de la inhibición de la PKA por el agregado de KT-5720 (Figura I.11) podría ser consecuencia de un aumento transitorio en el número de canales insertos en la membrana que suceda de forma relativamente rápida tras la adición de la droga, pero también otras explicaciones, relacionadas con la velocidad de transición entre los diferentes estados conformacionales del receptor, son posibles. De la misma manera, la ausencia de efectos en la cinética de $\alpha 7$ por activación o inhibición de la PKC está en línea con un estudio que demuestra que la amplitud y desensibilización de las corrientes macroscópicas del receptor salvaje no se ven modificadas luego del tratamiento con PMA que activa a la PKC (Tsuneki et al., 2007). Lo interesante de este trabajo es que el mutante $\alpha 7$ -G423S, con un sitio adicional de fosforilación para PKC, es sensible a la activación de dicha quinasa, dándole de esta manera más fuerza al resultado que muestra la ausencia de efecto sobre el receptor salvaje.

En síntesis, los resultados presentados en este capítulo señalan que la fosforilación de las Tyr, si bien es absolutamente necesaria para la actividad metabotrópica de $\alpha 7$ mediada por la vía ERK 1/2, actúa como un modulador negativo de la actividad ionotrópica del receptor (Figura I.14). En cambio, en el sistema experimental aquí utilizado, las alteraciones en el estado de fosforilación de Ser y Thr no juegan un rol muy importante en la modulación de la actividad ionotrópica de $\alpha 7$.

Es posible sugerir que la fosforilación de las Tyr del ICD reduce la barrera energética de la transición entre el estado abierto y el desensibilizado de $\alpha 7$, y a la vez aumenta la barrera energética entre los estados desensibilizado y cerrado en reposo desde el cual el canal puede volver a abrirse. En concordancia con la conclusión de que la fosforilación

afecta directamente la función de $\alpha 7$, se ha demostrado que esta MPT puede causar cambios conformacionales alostéricos globales en los GlyR (Han et al., 2013). Además, se ha propuesto que las conformaciones fosforiladas podrían, en principio, ser objeto de fármacos con potencial terapéutico (Talwar y Lynch, 2014). Como prueba de concepto, se demostró que un derivado no anestésico del propofol, es accesible a su sitio de unión al GlyR $\alpha 3\beta$ solo después de la fosforilación dependiente de PKA (Acuña et al., 2016).

Dado que $\alpha 7$ es altamente permeable al Ca^{2+} , la disminución de la fosforilación puede actuar, al aumentar la actividad ionotrópica del receptor, como un mecanismo regulador que mejora la entrada del catión a la célula, lo que a su vez conduce a la mayoría de las funciones de $\alpha 7$, incluida la liberación de neurotransmisores, la despolarización postsináptica, y la activación de ciertos procesos de señalización celular (Gotti y Clementi, 2004). Además, este aumento transitorio de Ca^{2+} , potenciado por la desfosforilación del receptor, se convierte en un fenómeno sostenido de amplio alcance por la liberación de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares a través de un mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio (Bouzat et al., 2018; Corradi y Bouzat, 2016a). Por otro lado, la disminución de la fosforilación de $\alpha 7$ reduce las respuestas metabotrópicas que requieren residuos de Tyr fosforilados, como la vía ERK 1/2, y por ende redirige las respuestas a las que se rigen principalmente por su actividad ionotrópica o por el influjo de Ca^{2+} . Por lo tanto, los eventos de fosforilación/desfosforilación de las Tyr de $\alpha 7$ permiten un control preciso de la respuesta celular integrada iniciada por la activación del receptor, lo que tiene un amplio impacto en la señalización colinérgica de $\alpha 7$ y en su participación en trastornos humanos, como enfermedades neurodegenerativas, cáncer y alteraciones inflamatorias.

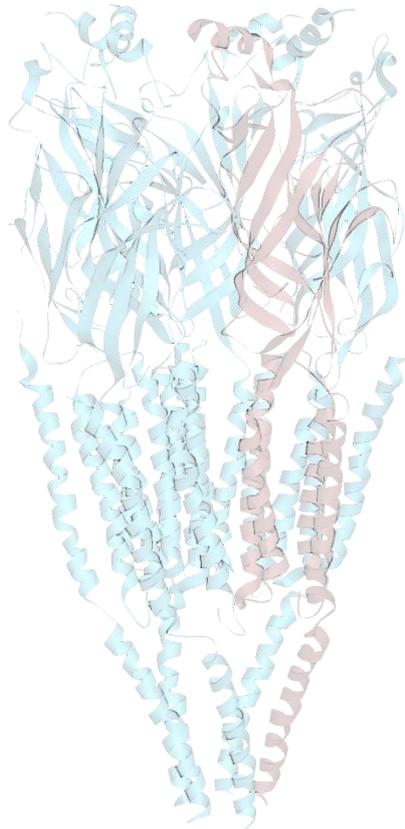


FIGURA I.14. Modelo de las interrelaciones entre las respuestas ionotrópicas y metabotrópicas de $\alpha 7$ y su regulación por fosforilación.

La ilustración representa un modelo del rol que cumple la fosforilación de las Tyr del ICD de $\alpha 7$ en la modulación de las respuestas ionotrópicas y metabotrópicas del receptor.

CAPÍTULO II

MODULACIÓN DEL RECEPTOR $\alpha 7$ POR EL FRAGMENTO Y674-R685 DE LA GLICOPROTEÍNA S DEL SARS-CoV-2



INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad por Coronavirus 2019

El 31 de diciembre de 2019, las autoridades de salud de Wuhan, China, notificaron a la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre un brote de neumonía de causa no identificada (Z. Wu y McGoogan, 2020). A partir del aislamiento del virus de muestras de líquido de lavado broncoalveolar de pacientes graves, se secuenció el ARN metagenómico y se identificó que el agente causante de esta enfermedad emergente era un nuevo virus perteneciente a la familia *Coronaviridae* y al género *Betacoronavirus* (Zhou et al., 2020). Esta nueva neumonía por coronavirus pronto se extendió a otras ciudades de China y el número de casos confirmados aumentó repentinamente, con miles de casos nuevos diagnosticados diariamente a fines de enero. El 30 de enero de 2020, la OMS declaró al brote del nuevo coronavirus como una emergencia de salud pública de importancia internacional. El 11 de febrero, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus nombró al nuevo virus como Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), y la OMS nombró a la enfermedad como “Enfermedad por Coronavirus 2019” (COVID-19, *Coronavirus Disease 2019*) (Gorbalenya et al., 2020). El brote de la COVID-19 en China alcanzó un pico epidémico en febrero, y desde allí la propagación internacional se aceleró. La alta eficiencia de transmisión del SARS-CoV-2 y la abundancia de viajes internacionales permitieron la rápida propagación mundial de la COVID-19 y así el 11 de marzo de 2020, la OMS la caracterizó oficialmente como una pandemia (Hu et al., 2021).

La enfermedad causada por la infección por el SARS-CoV-2 en humanos tiene un gran espectro de manifestaciones que van desde síntomas leves hasta insuficiencia respiratoria grave. Los síntomas más comunes son fiebre, fatiga, dolor de cabeza, tos seca y trastornos del olfato y del gusto, mientras que menos comúnmente hay producción de esputo, hemoptisis, diarrea, anorexia, dolor de garganta, dolor de pecho, escalofríos, náuseas y vómitos (C. Huang et al., 2020). Al unirse a las células epiteliales del tracto respiratorio alto, el SARS-CoV-2 comienza a replicarse y migrar hacia las vías respiratorias bajas, para finalmente entrar en las células epiteliales alveolares. La rápida replicación del SARS-CoV-2 en los pulmones puede desencadenar una fuerte respuesta inmunitaria, llevando a una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias

(tormenta de citoquinas) que conduce al síndrome de dificultad respiratoria aguda e insuficiencia respiratoria, que se considera la principal causa de muerte en pacientes con la COVID-19 (Mehta et al., 2020). Los pacientes de mayor edad y con enfermedades preexistentes graves tienen mayor riesgo de desarrollar síndrome de distrés respiratorio agudo y muerte.

2. SARS-CoV-2

Los coronavirus son un grupo diverso de virus que infectan a muchos animales diferentes y pueden causar infecciones respiratorias en humanos desde leves a graves. En 2002 y 2012, respectivamente, dos coronavirus altamente patógenos con origen zoonótico, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV, *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*), surgieron en humanos y causaron enfermedades respiratorias fatales. Por su parte, el SARS-CoV-2 es altamente transmisible y ha superado abrumadoramente al SARS-CoV y al MERS-CoV tanto en términos de número de personas infectadas como de rango espacial de áreas epidémicas (Cui et al., 2019).

Los viriones del SARS-CoV-2 tienen una forma esférica o elipsoidal con un diámetro promedio de 108 ± 8 nm (Figura II.1A), y su genoma de ARN monocatenario de sentido positivo posee casi treinta mil nucleótidos de longitud (Liu et al., 2020). Su organización genómica es similar a la de otros virus del género *Betacoronavirus*. Posee seis marcos de lectura abiertos (ORF, *Open Reading Frames*) funcionales dispuestos en orden 5' a 3': replicasa (ORF1a/ORF1b), proteína espiga (S), proteína de envoltura (E), proteína de membrana (M) y proteína de la nucleocápside (N). Además, cuenta con siete ORF putativos intercalados entre los genes estructurales que codifican proteínas accesorias (Fuk-Woo Chan et al., 2020). El gen de la replicasa cubre dos tercios del genoma y codifica una poliproteína grande que se escinde proteolíticamente en 16 proteínas no estructurales que están involucradas en la transcripción y replicación del virus.

La proteína espiga (Proteína S, *Spike Protein*) es una glicoproteína homotrimérica de fusión que se encuentra en la superficie del SARS-CoV-2 (Figura II.1B). Es la proteína que más diverge dentro de los miembros del subgénero *Sarbecovirus*, compartiendo solo un 77 % de similitud de secuencia de aminoácidos con la del SARS-CoV (R. Lu et al., 2020). Cada monómero S es una proteína transmembrana de tipo I de 1273 aminoácidos que se

compone de dos subunidades: S1 y S2 (Figura II.1B). La proteína S es la encargada de reconocer y unirse al receptor de la célula huésped (rol de S1), para luego llevar a cabo la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática celular (rol de S2), y permitir así el ingreso del ARN viral a la célula (F. Li, 2016; Walls et al., 2020). Dentro de la subunidad S1 existe un dominio de unión al receptor (RBD, *Receptor Binding Domain*, Figuras II.1B y II.2A) que es el responsable de la unión a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, *Angiotensin-converting Enzyme 2*). Esta proteína de la superficie celular funciona como el receptor del SARS-CoV-2, de la misma forma que lo es para el SARS-CoV. El RBD es una región en el C-terminal de S1 (aminoácidos 319-541) que contiene el motivo de unión al receptor (RBM, *Receptor Binding Motif*, aminoácidos 437-508), responsable de mediar el contacto con la ACE2. El RBM del SARS-CoV-2 difiere en cinco residuos críticos (Y455L, L486F, N493Q, D494S y T501N) con el de SARS-CoV. Las características estructurales del RBM del SARS-CoV-2 han fortalecido su afinidad de unión a la ACE2 en comparación con el del SARS-CoV (Shang, Ye, et al., 2020; Walls et al., 2020).

La proteína S tiene dos sitios principales de escisión por proteasas celulares: (i) el sitio S1/S2, que divide la subunidad S1 de la subunidad S2; y (ii) el sitio S2' dentro de la subunidad S2. La característica distintiva de la proteína S del SARS-CoV-2 es la presencia de un motivo de escisión por furina (FCM, *Furin Cleavage Motif*) en el sitio S1/S2: 682-RRAR↓S-686 (la flecha indica el sitio de escisión, Figura II.1B) que surgió por inserción de cuatro aminoácidos (681-PRRA-684). Este FCM está ausente en el SARS-CoV y en el pariente más cercano del SARS-CoV-2, la cepa RaTG13 de murciélago (K. G. Andersen et al., 2020). Esta característica distintiva es uno de los motivos que da sustento al argumento de la generación artificial del SARS-CoV-2. La adquisición de un FCM aumenta en gran medida la virulencia de los virus de influenza A aviar, y es posible que esta inserción de 4 aminoácidos esté involucrada en la expansión del rango de huéspedes y la adaptación a los humanos por parte del SARS-CoV-2 (K. G. Andersen et al., 2020; Hoffmann, Kleine-Weber, y Pöhlmann, 2020; Walls et al., 2020).

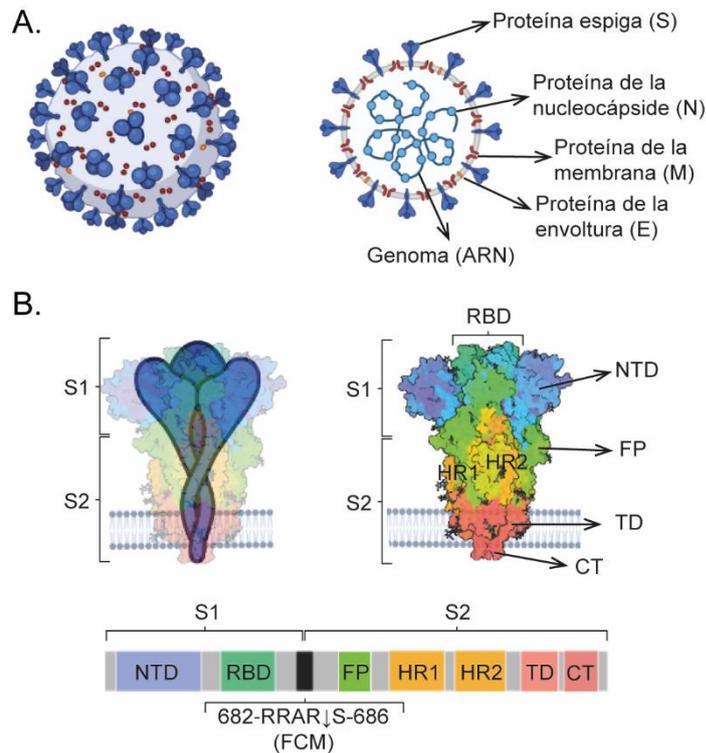


FIGURA II.1. Representaciones ilustrativas del SARS-CoV-2 y de la proteína espiga (S).

(A) Dibujo ilustrativo de una partícula viral del SARS-CoV-2. Se esquematiza el genoma de ARN monocatenario en el interior de la envoltura viral asociado a la proteína de la nucleocápside (N). En la superficie se ilustra la envoltura viral con sus proteínas constituyentes: proteína de la envoltura (E), proteína de la membrana (M) y proteína espiga (S). Creado con BioRender.com.

(B) A la izquierda se observa un dibujo ilustrativo de la glicoproteína S homotrimérica (azul traslúcido) sobre la estructura cristalográfica trasparentada. Se indican con corchetes las regiones correspondientes a las subunidades S1 y S2. A la derecha se muestra la estructura cristalográfica de la proteína S vista por microscopía electrónica (PDB 6VXX), y se señalan los dominios más relevantes, que son representados también en la secuencia lineal de la proteína dibujada en la parte inferior. NTD: dominio N-terminal; RBD: dominio de unión al receptor; FCM: motivo de escisión por furina (se muestran los aminoácidos y el sitio exacto de corte); FP: péptido de fusión (dentro de S2, en dirección N-terminal de FP se encuentra el sitio de escisión S2'); HR1: "hepted repeat" 1; HR2: "hepted repeat" 2; TD: dominio transmembrana; y CT: cola citoplasmática. Creado con BioRender.com.

La furina es una convertasa que se expresa de forma ubicua en las vías de síntesis y transporte de proteínas de las células. Por lo tanto, el sitio S1/S2 de la proteína S se escinde con furina durante su biosíntesis en el proceso de formación de nuevas partículas virales, y las dos subunidades resultantes, S1 y S2, permanecen asociadas no covalentemente (Shang, Wan, et al., 2020; Walls et al., 2020). Este clivaje es muy importante porque desestabiliza la proteína S permitiéndole al RBD hacer un movimiento similar a una bisagra y cambiar su posición de una conformación doblada ("cerrada") a

una expuesta (“abierta”) necesaria para unirse de manera eficiente a la ACE2 de la siguiente célula a infectar. El porcentaje de proteínas S que se escinden se ve muy afectado por la secuencia de aminoácidos del FCM, y la escisión suele ser parcial (Takeda, 2022; Walls et al., 2020). La mutación D614G en la proteína S aumenta la eficiencia de la escisión S1/S2 por la furina y, por lo tanto, facilita la adopción de la conformación “abierta” que favorece la unión a la ACE2. La variante del SARS-CoV-2 con esta mutación surgió temprano en la epidemia y se convirtió en una de las principales causas de la pandemia global debido a su mayor infectividad (Korber et al., 2020; Yurkovetskiy et al., 2020). Otra mutación en el sitio S1/S2 (P681R) es portada por la variante delta, que al agregar un aminoácido básico al FCM, aumenta la eficiencia de la escisión de la proteína S y por lo tanto la infectividad viral (Saito et al., 2022).

Por otro lado, la escisión del sitio S2' ocurre después de que la proteína S se une a la ACE2, no durante la biosíntesis o el transporte intracelular de la proteína. El cambio conformacional de la proteína S, inducido por la unión a la ACE2, expone el sitio S2' permitiendo que la serina proteasa celular de transmembrana 2 (TMPRSS2, *Transmembrane Serine Protease 2*) lleve a cabo el clivaje. Este proceso es fundamental porque expone al péptido hidrofóbico de fusión (FP, *Fusion Peptide*), ubicado inmediatamente río abajo de S2', que es responsable de la fusión de las membranas viral y celular, permitiendo la entrada del ARN viral a la célula (Hoffmann, Kleine-Weber, Schroeder, et al., 2020; Matsuyama y Taguchi, 2009).

La escisión S1/S2 también puede tener un significado adicional, ya que se ha demostrado que la neuropilina-1 se une a la secuencia 682-RRAR-685 en el extremo C-terminal de la subunidad S1 generada tras el corte por furina, y que esta unión potencia la infección por el SARS-CoV-2 mediada por la ACE2. La unión de S1 a la ACE2 es esencial para el ingreso del ARN viral a la célula huésped (Hoffmann, Kleine-Weber, Schroeder, et al., 2020; Yan et al., 2020), pero la infectividad también se ve afectada por interacciones adicionales entre S1 y el receptor de neuropilina-1 (Cantuti-Castelvetri et al., 2020; Daly et al., 2020). La base molecular del efecto no está clara, pero se sabe que las neuropilinas median la internalización de los péptidos que contienen el motivo de unión R/K-X-X-R/K (donde X puede ser cualquier aminoácido) a través de un proceso endocítico que se asemeja a la macropinocitosis. Se ha sugerido que la proteína S también contribuye a la fisiopatología de la COVID-19 a través de interacciones directas o indirectas con otras proteínas, como los nAChR (Changeux et al., 2020; Farsalinos, Eliopoulos, et al., 2020;

Oliveira et al., 2021; Tillman et al., 2023) y los canales de sodio epiteliales (Grant y Lester, 2021).

3. Asociación entre el SARS-CoV-2 y los nAChR

La asociación entre los nAChR y el SARS-CoV-2 fue planteada a los comienzos de la pandemia por varios autores (Changeux et al., 2020; Farsalinos, Niaura, et al., 2020; Gonzalez-Rubio et al., 2020) en la forma de la “Hipótesis Nicotínica de la COVID-19”, la cual postula que el SARS-CoV-2, al interactuar con los nAChR, altera la vía antiinflamatoria colinérgica causando una variedad de manifestaciones clínicas, y que la nicotina, al actuar sobre estos receptores, sirve para prevenir este proceso.

Son varias las observaciones en las que se basaron los autores para argumentar esta teoría. Entre ellas, se destacan varios estudios epidemiológicos que muestran menor prevalencia de fumadores en personas con la COVID-19 que en la población general (Changeux et al., 2020; Gonzalez-Rubio et al., 2020), lo cual es paradójico considerando que está bien establecido que los fumadores tienen un riesgo significativamente mayor de enfermedad respiratoria crónica e infecciones respiratorias agudas. Por ejemplo, un trabajo informó que, en comparación con la población francesa general, la población con la COVID-19 exhibió una tasa de fumadores significativamente menor, tanto para pacientes ambulatorios como para aquellos hospitalizados (Miyara et al., 2022). Además, otro estudio reportó que el número de fumadores hospitalizados en el brote de SARS-CoV-2 en China fue más bajo de lo esperado en comparación con la prevalencia del tabaquismo en ese país (Gonzalez-Rubio et al., 2020). Así, el consumo de tabaco parece ser un factor protector frente a la infección por el SARS-CoV-2. Estos datos son consistentes con la hipótesis de que la nicotina del cigarrillo tiene un papel protector a través de la acción directa sobre varios tipos de nAChR expresados en neuronas, células inmunitarias, tejido cardíaco, pulmones y vasos sanguíneos (Changeux et al., 2020).

A su vez, el hecho de que la mayoría de las manifestaciones clínicas de la COVID-19 puedan explicarse por una desregulación de la vía colinérgica antiinflamatoria, con la consecuente producción excesiva de citoquinas proinflamatorias, argumenta a favor de la hipótesis nicotínica. El SN, a través del nervio vago, puede inhibir la liberación de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos y atenuar las respuestas inflamatorias sistémicas (H. Wang et al., 2003). La ACh liberada por el nervio vago o producida localmente, actuando a través de los nAChR $\alpha 7$, es uno de los mecanismos de control de la

producción de citoquinas por los macrófagos, uno de los principales tipos de células que se encuentra en el líquido broncoalveolar de los pacientes con la COVID-19 (Changeux et al., 2020; Pavlov y Tracey, 2012). La desregulación de este receptor lleva a la producción masiva de interleuquinas 1, 6 y 18, y factor de necrosis tumoral α . Este perfil de citoquinas es similar al descrito en pacientes con la COVID-19 que presentaron el síndrome hiperinflamatorio (Chen et al., 2020). Además, en línea con esta hipótesis, la alta prevalencia de obesidad y diabetes mellitus observada en formas graves de la COVID-19 podría explicarse considerando que estos pacientes presentan una disminución de la actividad vagal debido a su patología de base (Pavlov y Tracey, 2012) a la que se sumaría la disfunción de los nAChR por el SARS-CoV-2, llevando de esta manera a un estado hiperinflamatorio más acentuado.

Por otro lado, la disfunción del receptor nicotínico $\alpha 7$ en plaquetas aumenta el estado reactivo de las mismas, lo que podría explicar la coagulopatía sistémica con trombosis venosa y arterial, que es uno de los aspectos críticos de la morbimortalidad de la COVID-19 (Kooijman et al., 2015). Por su parte, la anosmia que presentan algunas personas con la COVID-19 puede deberse a disfunción de los nAChR que están altamente expresados en el bulbo olfatorio (D'Souza y Vijayaraghavan, 2014).

Por último, el extremo C-terminal de la subunidad S1 de la proteína S del SARS-CoV-2, que contiene la inserción de los cuatro aminoácidos que crean el FCM ausente en otros coronavirus, tiene cierto grado de homología de secuencia con: (i) antagonistas de nAChR, como las neurotoxinas de venenos de serpientes (α -cobratoxina y α -bungarotoxina); y (ii) una región con similitud a neurotoxinas encontrada en la glicoproteína del virus de la rabia (Changeux et al., 2020; Hueffer et al., 2017; Lentz et al., 1987). Se ha demostrado que el virus de la rabia utiliza a los nAChR durante la infección (Lentz et al., 1982), y que un péptido de la región similar a neurotoxina de la glicoproteína viral tiene la capacidad de inhibir las respuestas de los nAChR $\alpha 4\beta 2$ *in vitro*. El mismo péptido también produce alteración en un comportamiento de *Caenorhabditis elegans* que es controlado por los nAChR (Hueffer et al., 2017).

Se cree que las interacciones entre la proteína S del SARS-CoV-2 y los nAChR ocurren a través del *loop* expuesto de la región C-terminal de la subunidad S1 (fragmento Y674-R685, Figura II.2A). Recientemente se ha examinado la posible unión de Y674-R685 a varios nAChR mediante simulaciones de dinámica molecular (Oliveira et al., 2021). Estas simulaciones predijeron una unión favorable de la región Y674-R685 al sitio de unión

ortostérico de los nAChR $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ humanos (Figura II.2B) y del nAChR muscular de *T. californica* (Oliveira et al., 2021). Además, los análisis de las simulaciones de dinámica molecular de la proteína S entera y completamente glicosilada mostraron que la región Y674-R685 está accesible para la unión.

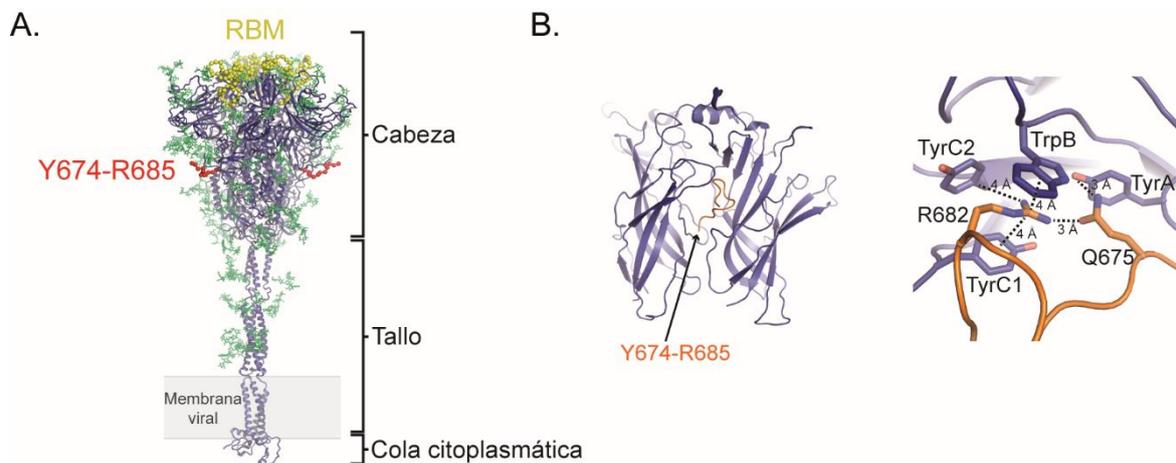


FIGURA II.2. Estructura tridimensional de la proteína S del SARS-CoV-2.

(A) El modelo representa la proteína S entera, completamente glicosilada, en estado cerrado después de la escisión con furina (Casalino et al., 2020). Cada monómero S está formado por tres dominios: cabeza, tallo y cola citoplasmática. La proteína se representa en azul con los glicanos en verde. El RBM y la región Y674-R685 están resaltados en amarillo y rojo, respectivamente.

(B) Ejemplo de una conformación obtenida de las simulaciones de dinámica molecular. Izquierda: vista general del complejo Y674-R685/ $\alpha 7$ (ECD). Derecha: vista ampliada del sitio de unión a agonista mostrando las interacciones (líneas punteadas) entre R682 y Q675 y los anillos aromáticos de TrpB (W171), TyrC1 (Y210), TyrC2 (Y217) y TyrA (Y115). El receptor $\alpha 7$ y el fragmento Y674-R685 están coloreados en azul oscuro y naranja, respectivamente.

Entre los nAChR, la unión de Y674-R685 al subtipo $\alpha 7$ es muy relevante para la COVID-19, ya que la nicotina, al actuar a través de este receptor, puede regular la expresión de la ACE2 (P. Russo et al., 2020). Además, la activación de $\alpha 7$ reduce la inflamación y el daño tisular mediante una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias (Egea et al., 2015; Rosas-Ballina et al., 2008; H. Wang et al., 2003). Es así que, la potenciación de $\alpha 7$ se ha convertido en una estrategia importante para modular la inflamación en diferentes contextos patológicos, incluido el síndrome de dificultad respiratoria aguda (Egea et al., 2015; Pinheiro et al., 2017). Por lo tanto, los ligandos que se unen a $\alpha 7$ pueden afectar la infectividad del SARS-CoV-2 y la progresión de la COVID-19. De hecho, recientemente se ha demostrado que la vareniclina, un agonista completo de $\alpha 7$, reduce la infectividad y la progresión de la enfermedad en un modelo de macaco Rhesus (Nau et al., 2021).

OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo de tesis es demostrar una interacción funcional entre el péptido sintético correspondiente a una región de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 (Y674-R685) y el receptor nicotínico $\alpha 7$ humano. Utilizando distintos enfoques electrofisiológicos, de corrientes macroscópicas y de canal único, se estudia si la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ es afectada por el péptido Y674-R685.

Los objetivos específicos son:

- Determinar si el fragmento Y674-R685 de la proteína S es capaz de activar al receptor $\alpha 7$ humano.
- Explorar la activación de $\alpha 7$ por una combinación del péptido Y674-R685 con distintos PAM del receptor (5-HI y PNU-120596).
- Evaluar la modulación de la actividad ionotrópica del receptor $\alpha 7$ por parte del fragmento peptídico Y674-R685 y descifrar el mecanismo involucrado.

RESULTADOS

1. Activación del nAChR $\alpha 7$ por el fragmento Y674-R685 de la proteína S del SARS-CoV-2

Las simulaciones de dinámica molecular del complejo formado entre el receptor $\alpha 7$ y el fragmento Y674-R685 de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 (Oliveira et al., 2021) sugirieron el potencial de la región Y674-R685 para interactuar con residuos aromáticos conservados dentro del bolsillo de unión del receptor (Figura II.2B). Para establecer inequívocamente la existencia de interacciones moleculares funcionales entre esta región de la glicoproteína S y $\alpha 7$ se evaluó si el péptido sintético YQTQTNSPRRAR (Y674-R685) podía actuar como agonista y disparar corrientes macroscópicas y/o microscópicas de dicho receptor expresado de forma heteróloga.

1.1. El fragmento Y674-R685 es incapaz de activar al receptor $\alpha 7$

En primer lugar, se ensayó la capacidad del fragmento proteico de actuar como agonista a nivel de corrientes macroscópicas en ovocitos de rana (*X. laevis*) expresando de forma heteróloga el receptor $\alpha 7$ humano. Las respuestas macroscópicas del receptor a las aplicaciones del fragmento Y674-R685 en una amplia gama de concentraciones (1 pM-10 μ M) se examinaron junto con las respuestas control evocadas por ACh en las mismas células. El fragmento Y674-R685 no provocó corrientes detectables en ninguna de las concentraciones ensayadas en contraposición con las respuestas robustas provocadas por ACh 100 μ M. Después de 5 minutos de lavado, los receptores siguieron respondiendo a las aplicaciones control con ACh (Figura II.3).

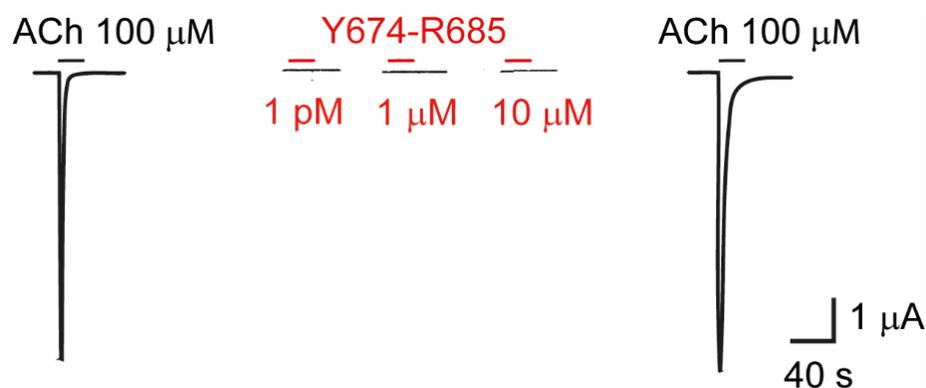


FIGURA II.3. Y674-R685 no provoca respuestas macroscópicas detectables de $\alpha 7$.

Corrientes macroscópicas representativas del receptor $\alpha 7$ humano expresado de forma heteróloga en ovocitos de rana obtenidas por la técnica de *voltage-clamp* de dos electrodos. Potencial de membrana: -60 mV. Trazos representativos luego de la aplicación de ACh 100 μ M (negro) o Y674-R685 1 pM, 1 μ M o 10 μ M (rojo). Las aplicaciones fueron de 20 segundos, seguidas de un lavado de 300 segundos.

La imposibilidad de detectar corrientes macroscópicas no necesariamente implica que tampoco podrán evidenciarse respuestas a nivel de canal único. Por ello, se registraron corrientes unitarias del receptor $\alpha 7$ expresado en células BOSC23. Los registros se realizaron en la configuración *cell-attached* utilizando como agonista en la pipeta al péptido Y674-R685. En ninguno de los 21 sellos de las 5 concentraciones diferentes ensayadas se detectó actividad del canal (1 pM: n = 3, N = 1; 1 nM: n = 3, N = 1; 1 μ M: n = 8, N = 2; 10 μ M: n = 3, N = 1; 100 μ M: n = 4, N = 2) (Figura II.4, derecha). En paralelo, se realizaron registros control con ACh 100 μ M en la pipeta para confirmar la presencia de receptores $\alpha 7$ funcionales en el mismo lote de células y bajo las mismas condiciones de transfección y registro. En el 95% (38/40) de los sellos se detectó actividad del canal $\alpha 7$ que, como se ha detallado en el capítulo I de esta tesis, se evidencia como aperturas aisladas y, menos frecuentemente, como *bursts* (Figura II.4, izquierda).

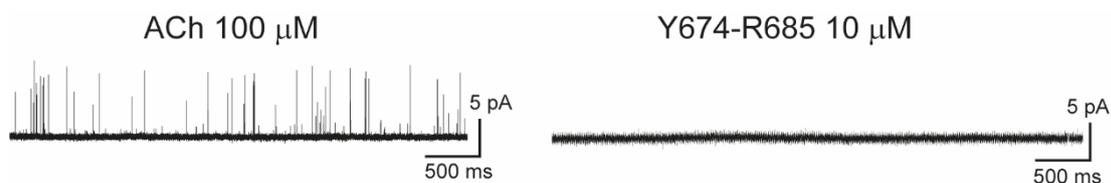


FIGURA II.4. Y674-R685 no provoca respuestas microscópicas detectables de $\alpha 7$.

Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μ M (izquierda) o Y674-R685 10 μ M (derecha) obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. No se detectó actividad del canal con Y674-R685 como agonista en un rango de concentración de 1 pM a 100 μ M. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

1.2. El fragmento Y674-R685 es capaz de activar a $\alpha 7$ en presencia de PAM

Los episodios de activación de $\alpha 7$ a nivel de canal único con ACh 100 μ M son muy breves y aislados, es decir, la probabilidad de apertura del receptor con su agonista endógeno es baja (Figura II.4, izquierda). Teniendo en cuenta esto, surge la necesidad de explorar si el fragmento Y674-R685 puede inducir la activación del receptor en presencia de PAM que aumentan la probabilidad de apertura del canal. Los ligandos que no

provocan actividad ionotrópica de $\alpha 7$, o lo hacen con una eficacia extremadamente baja, pero que actúan como agonistas en presencia de un PAM se han denominado agonistas silentes (Blunt y Dougherty, 2019; Chojnacka et al., 2013; Papke y Lindstrom, 2020).

1.2.1. El péptido Y674-R685 activa a $\alpha 7$ en presencia de PNU-120596

En primera instancia, con el objetivo de determinar si Y674-R685 es un agonista silente de $\alpha 7$, se eligió como PAM específico al PNU-120596. Este compuesto ha sido utilizado ampliamente como herramienta en estudios funcionales del receptor debido a su capacidad para aumentar la probabilidad de apertura del canal activado por agonistas, incrementar la duración de los episodios de activación y reducir la velocidad de desensibilización (PAM tipo II) (C. J. B. daCosta et al., 2011). Es importante resaltar que el PNU-120596 por sí solo no puede inducir la activación del canal, sino que potencia la actividad del receptor activado por un agonista (R. S. Hurst et al., 2005).

Se realizaron registros de corrientes macroscópicas en ovocitos de *X. laevis* expresando $\alpha 7$ por la técnica de *voltage-clamp* de dos electrodos utilizando una combinación de Y674-R685 1 μM y PNU-120596 10 μM para provocar las respuestas. En el 30 % de los ovocitos ensayados se detectaron corrientes con amplitudes de 15-20 nA ($n = 15$, $N = 3$), mientras que no se observaron respuestas macroscópicas detectables con la aplicación individual de Y674-R685 1 μM (Figura II.5) o de PNU-120596 10 μM .

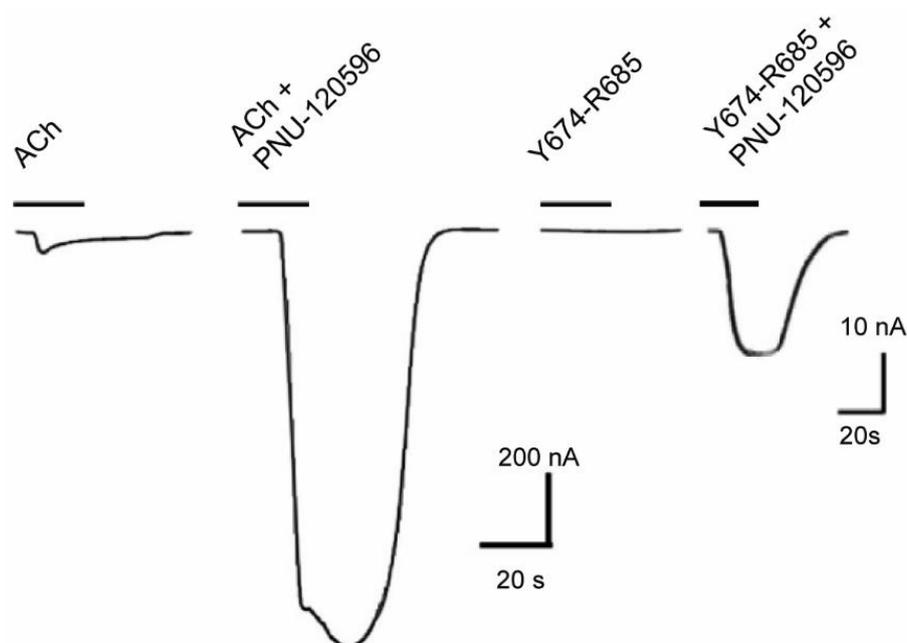


FIGURA II.5. Activación de $\alpha 7$ humano por Y674-R685 en presencia de PNU-120596.

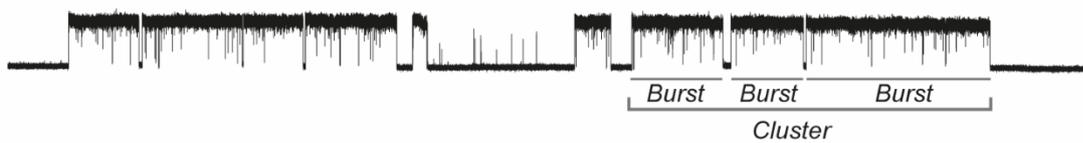
Corrientes macroscópicas representativas del receptor $\alpha 7$ humano expresado de forma heteróloga en ovocitos de rana obtenidas por la técnica de *voltage-clamp* de dos electrodos. Potencial de membrana: -60 mV. Trazos representativos luego de la aplicación de un pulso de ACh 30 μM o de Y674-R685 1 μM en ausencia o presencia de PNU-120596 10 μM .

Para profundizar más en el mecanismo de activación de $\alpha 7$ por Y674-R685 en presencia de PNU-120596, se realizaron registros de canal único en la configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 expresando el receptor. La condición control, en la que se utilizó en la pipeta una combinación de ACh 10 μM , como agonista, y PNU-120596 1 μM , como PAM, permitió evidenciar las profundas diferencias en el perfil de activación del receptor en presencia del modulador (Figura II.6, trazo superior) en comparación con el perfil en su ausencia (Figura II.4, izquierda). En lugar de breves aperturas aisladas de menos de 1 ms, la actividad del canal en presencia PNU-120596 muestra largos períodos de aperturas de alta frecuencia, denominados *clusters*, con una duración media de $\sim 1\text{-}3$ s (τ_{cluster}). Un *cluster* corresponde a un episodio de activación de una única molécula de receptor que se recupera de la desensibilización y oscila entre estados abiertos y cerrados antes de alcanzar nuevamente el estado desensibilizado no conductor más estable (C. J. B. daCosta et al., 2011). Los *clusters* se componen de *bursts* con duraciones medias de $\sim 200\text{-}500$ ms (τ_{burst}), que a su vez comprenden eventos de apertura sucesivos de ~ 150 ms (τ_{open}) separados por cierres muy breves (Figuras II.6 y II.7) (N. D. Andersen et al., 2016; C. J. B. daCosta et al., 2011).

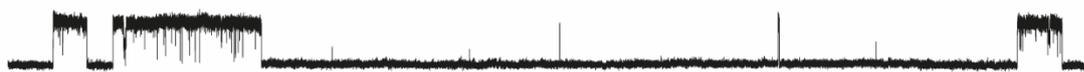
En presencia de PNU-120596 1 μM , el fragmento Y674-R685 fue capaz de activar al receptor $\alpha 7$ en una amplia gama de concentraciones, desde 1 pM a 10 μM (Figura II.6), lo que refuerza la idea de que este pequeño péptido derivado de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 puede actuar como un agonista silente del receptor, ya que solo lo activa en presencia de un PAM (Chojnacka et al., 2013; Papke y Lindstrom, 2020). Es importante destacar dos observaciones que surgen de estos experimentos: (i) no todos los sellos obtenidos en las diferentes concentraciones de Y674-R685 ensayadas evidenciaron actividad del canal; y (ii) aquellos sellos que sí presentaron actividad, tuvieron baja frecuencia de eventos si se los compara con los registros control con ACh y PNU-120596. Si bien es cierto que este tipo de ensayos no permite una comparación precisa del porcentaje de sellos con actividad (“sellos activos”) y del grado de actividad del canal, ya que pueden existir variaciones en estos parámetros debido a cambios en los niveles de expresión del receptor entre los diferentes sellos, estas dos observaciones, sumadas a la necesidad de un PAM para ver canales, sugieren un agonismo muy débil, por parte de

Y674-R685. Comparado con controles en paralelo realizados con ACh y PNU-120596, que mostraron un 95 % de sellos con actividad (n = 19; N = 5), el porcentaje de “sellos activos” con Y674-R685 y el PAM fue menor: 65 % (n = 23; N = 4; Y674-R685 1 pM), 40 % (n = 15; N = 4; Y674-R685 1 nM), 67 % (n = 15; N = 4; Y674-R685 1 μ M) y 62 % (n = 13; N = 3; Y674-R685 10 μ M). Además, la actividad del canal (frecuencia de episodios de activación) provocada por las diferentes concentraciones de Y674-R685 en presencia de PNU-120596, fue mucho menor y estuvo intercalada por períodos silentes (sin canales) más largos en comparación con la evocada por ACh y el PAM (Figura II.6).

ACh 10 μ M + PNU-120596 1 μ M



Y674-R685 1 pM + PNU-120596 1 μ M



Y674-R685 1 nM + PNU-120596 1 μ M



Y674-R685 1 μ M + PNU-120596 1 μ M



Y674-R685 10 μ M + PNU-120596 1 μ M

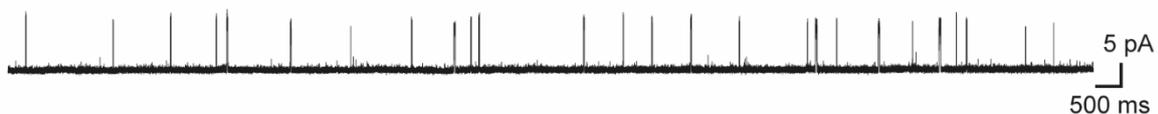


FIGURA II.6. Corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por Y674-R685 en presencia de PNU-120596.

Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ en presencia de PNU-120596 1 μ M activadas por ACh 10 μ M (trazo superior) o por diferentes concentraciones de Y674-R685 (1 pM, 1 nM, 1 μ M o 10 μ M; trazos inferiores) obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

Esto se evidencia muy marcadamente en los registros obtenidos con concentraciones muy bajas de Y674-R685 (1 pM) donde la frecuencia de episodios de activación es mucho menor si se la compara con los controles con ACh 10 μ M. Pero, aunque existe una diferencia marcada en el grado de actividad del canal entre estas dos condiciones, el perfil cinético de los episodios de activación es el mismo, es decir, la arquitectura y duración de los episodios de activación es similar. Esto último no se observa en las demás condiciones con concentraciones más altas de Y674-R685 (1 nM a 10 μ M), ya que al ir aumentando la concentración del fragmento se observan cambios profundos en el perfil cinético. Con el incremento de la concentración de Y674-R685 se observa un aumento en la frecuencia de los episodios de activación junto a una reducción en la duración de los mismos. Los típicos *clusters* de larga duración están completamente ausentes a concentraciones de Y674-R685 superiores a 1 μ M, en las que la activación del receptor se da principalmente en la forma de aperturas aisladas y *bursts* cortos (Figuras II.6 y II.7).

Con el objetivo de cuantificar las diferencias observadas en la duración de los episodios de activación descritas anteriormente, se construyeron los histogramas de duración de estado abierto, *bursts* y *clusters* para las distintas concentraciones de Y674-R685 en presencia de PNU-120596 (Figura II.7). Con Y674-R685 1 pM, las duraciones medias de las aperturas aisladas, *bursts* y *clusters* fueron: $\tau_{\text{open}} = 140 \pm 60$ ms, $\tau_{\text{burst}} = 418 \pm 110$ ms, y $\tau_{\text{cluster}} = 2330 \pm 670$ ms, respectivamente (n = 3; N = 3). Estos valores fueron similares a los del control con ACh 10 μ M y PNU-120596 1 μ M: $\tau_{\text{open}} = 148 \pm 12$ ms, $\tau_{\text{burst}} = 550 \pm 38$ ms, y $\tau_{\text{cluster}} = 3048 \pm 510$ ms (p = 0,859; p = 0,125; y p = 0,217 respectivamente; n = 3; N = 1), y también comparables a los informados en la bibliografía (N. D. Andersen et al., 2016; C. J. B. daCosta et al., 2011). Estos datos corroboran la observación previa de la ausencia de cambios en el perfil cinético entre Y674-R685 1 pM y ACh 10 μ M. Pero, aunque la duración media de los *clusters* fue similar en ambas condiciones, el área relativa del componente de mayor duración del histograma de *clusters* fue menor cuando Y674-R685 1 pM fue el agonista en comparación con ACh 10 μ M (Áreas relativas: $0,21 \pm 0,08$ y $0,44 \pm 0,09$ respectivamente; p = 0,0264; Figura II.7), indicando una reducción en la frecuencia de estos episodios de activación largos. Por otra parte, como se comentó anteriormente, con el aumento de la concentración de Y674-R685 se observó una reducción en las duraciones medias de las aperturas aisladas, *bursts* y *clusters*. El componente más lento de cada histograma redujo progresivamente su duración con el

aumento de la concentración de Y674-R685 (Figura II.7). Las duraciones medias para Y674-R685 1 μM fueron: $\tau_{\text{open}} = 48 \pm 13$ ms; $\tau_{\text{burst}} = 70 \pm 19$ ms; y $\tau_{\text{cluster}} = 104 \pm 41$ ms ($n = 3$; $N = 3$); y para Y674-R685 10 μM fueron: $\tau_{\text{open}} = 14 \pm 4$ ms; $\tau_{\text{burst}} = 20 \pm 8$ ms; $\tau_{\text{cluster}} = 30 \pm 15$ ms ($n = 4$; $N = 1$). Estos valores medios fueron significativamente diferentes a los del control con ACh 10 μM y PNU-120596 1 μM ($p = 0,000665$ y $p = 0,00000431$ para las aperturas aisladas; $p = 0,0000403$ y $p = 0,00000106$ para los *bursts*; $p = 0,000597$ y $p = 0,0000681$ para los *clusters*; para Y674-R685 1 y 10 μM respectivamente). En la concentración más alta de Y674-R685 (10 μM), la duración media de las aperturas aisladas fue similar a la duración media de los *bursts* y de los *clusters*, lo que indica que las aperturas ocurrieron principalmente de forma aislada, confirmando la ausencia de los típicos *clusters* de larga duración correspondientes a respuestas de $\alpha 7$ potenciadas.

ACh 10 μM + PNU-120596 1 μM

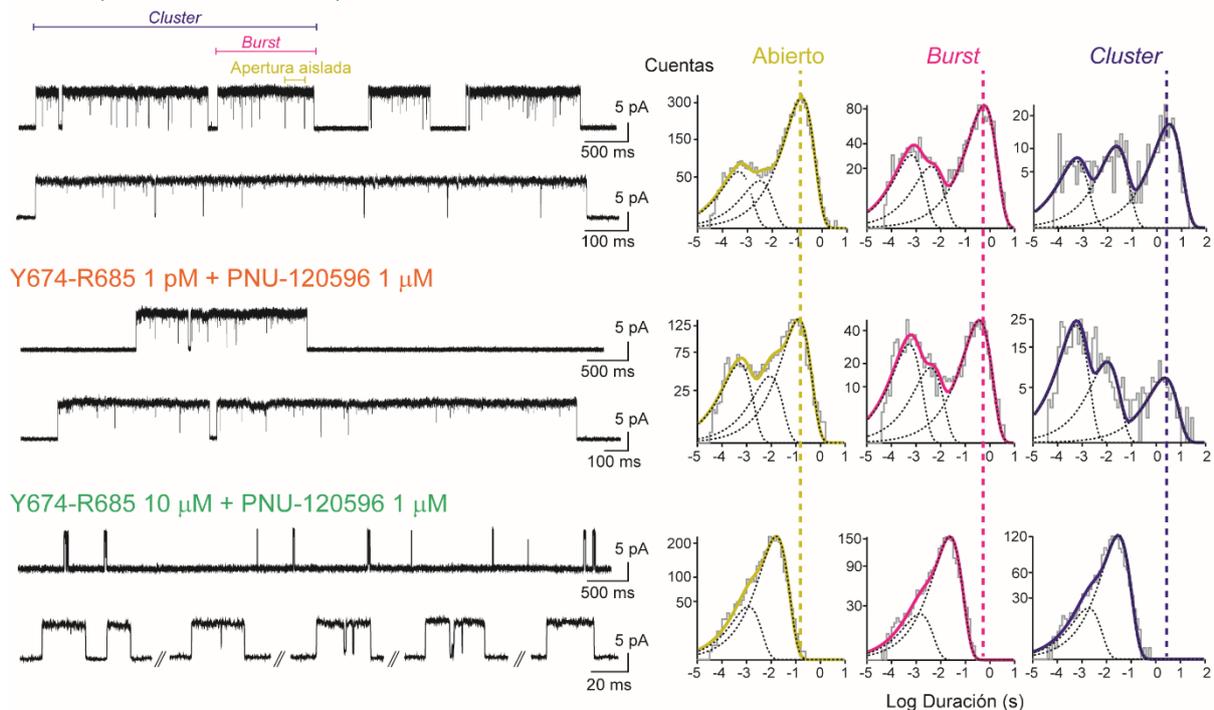


FIGURA II.7. Perfiles cinéticos de $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias activadas por diferentes concentraciones de Y674-R685 en presencia de PNU-120596.

(Izquierda) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ en presencia de PNU-120596 1 μM activadas por ACh 10 μM (trazo superior) o por Y674-R685 1 pM (trazo medio) o Y674-R685 10 μM (trazo inferior) obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. Para cada condición, se muestran los trazos de los canales en dos escalas temporales diferentes. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(Derecha) Histogramas representativos de estado abierto, de *bursts* y de *clusters* para cada condición. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos de cada histograma. Las líneas discontinuas verticales muestran cómo estas duraciones son similares entre Y674-R685 1 μM y ACh 10 μM , pero difieren con Y674-R685 10 μM .

Para corroborar que Y674-R685 provoca la activación del canal en presencia de PNU-120596 pero no en su ausencia, se siguió una estrategia diferente. Se realizaron registros de corrientes unitarias de $\alpha 7$ en la configuración *cell-attached* utilizando como agonista en la pipeta diferentes concentraciones del fragmento Y674-R685 (1 μM y 10 μM). De nuevo, no se detectó actividad del canal en ninguno de todos los sellos obtenidos ($n = 9$, $N = 2$). Sin embargo, la adición de PNU-120596 1 μM a la solución que baña a las células en la cápsula durante el transcurso de la grabación permitió evidenciar la aparición de canales en la mayoría de los sellos: 83,3 % y 100 % para Y674-R685 1 μM ($n = 6$; $N = 2$) y 10 μM ($n = 3$; $N = 2$), respectivamente (Figura II.8, trazo inferior). Este resultado ratifica que la activación de $\alpha 7$ por Y674-R685 requiere la presencia del PAM.

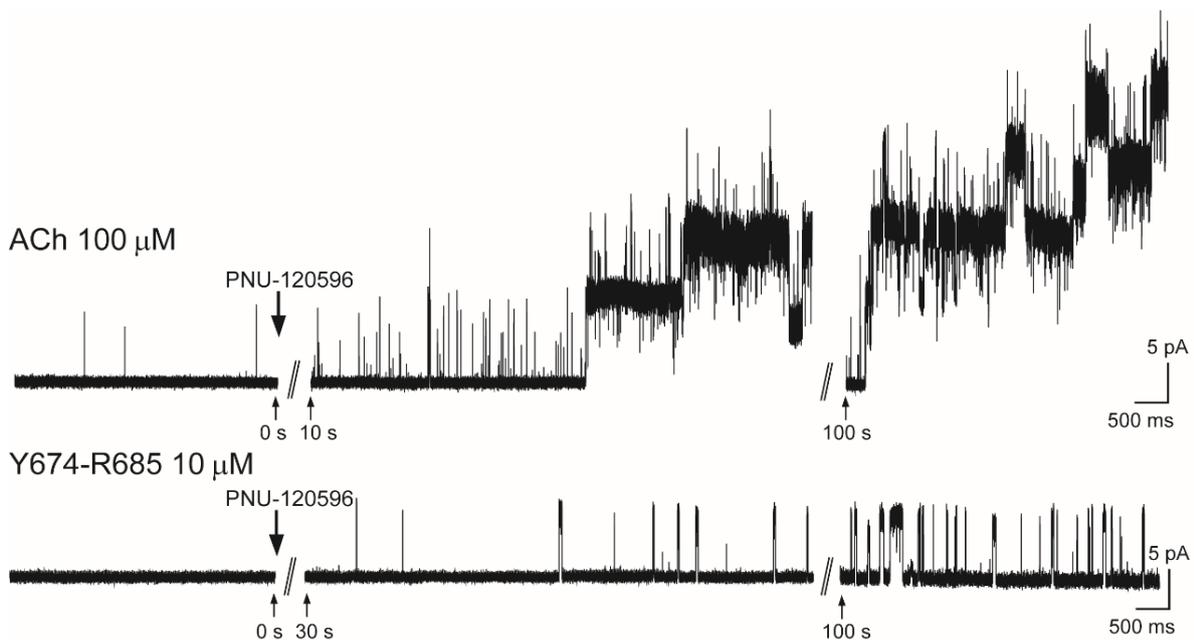


FIGURA II.8. Actividad del canal $\alpha 7$ provocada por Y674-R685 en ausencia o presencia de PNU-120596 en el mismo sello.

Registros representativos de la actividad del canal $\alpha 7$ obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*, antes y después de la adición de PNU-120596 al medio extracelular de la cápsula. La activación del receptor se realizó con ACh 100 μM (trazo superior) o Y674-R685 10 μM (trazo inferior) en la solución de la pipeta. El tiempo indicado corresponde al tiempo de grabación después de la adición de PNU-120596. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

La ventaja de esta estrategia es que permite comparar las dos condiciones, Y674-R685 en ausencia y en presencia de PNU-120596, en el mismo sello y por lo tanto con los mismos canales bajo el parche de membrana delimitado por la pipeta. Es decir, la ausencia de actividad del canal antes del agregado de PNU-120596 no se debe a la ausencia de receptores en la porción de membrana, sino al agonismo muy débil del péptido Y674-R685, ya que al agregar externamente el PAM los canales aparecen en el registro. La aplicación del mismo protocolo utilizando ACh 100 μ M como agonista en la pipeta mostró que las típicas aperturas breves y aisladas, características de $\alpha 7$ en ausencia de PAM, fueron reemplazadas por *clusters* de larga duración después de la adición de PNU-120596 (n = 4; N = 2; Figura II.8 trazo superior). Es interesante resaltar que, desde un punto de vista cualitativo, se observó una menor frecuencia y duración de los episodios de activación sostenidos tras el agregado del PAM en los sellos donde el agonista era Y674-R685 10 μ M con respecto a aquellos donde el agonista era ACh 100 μ M (Figura II.8), lo cual concuerda con los resultados detallados anteriormente (Figura II.7).

1.2.2. El péptido Y674-R685 activa a $\alpha 7$ en presencia de 5-HI

Teniendo en cuenta que PNU-120596 es un modulador muy potente y eficaz, con la capacidad de recuperar receptores desde el estado desensibilizado (PAM tipo II), se quiso explorar si Y674-R685 es capaz de activar al receptor $\alpha 7$ en presencia de un PAM tipo I (que incrementa el pico de corriente macroscópica pero no cambia la velocidad de desensibilización) como el 5-HI. Este compuesto induce potenciación con menor eficacia que PNU-120596 y no produce una recuperación significativa de los receptores desde el estado desensibilizado (N. D. Andersen et al., 2016; Nielsen et al., 2019; Zwart et al., 2002). Como se detalló en el capítulo I de esta tesis, los registros de canal único de $\alpha 7$ obtenidos en la configuración *cell-attached* utilizando ACh 100 μ M junto a 5-HI 2 mM en la pipeta muestran episodios de activación (aislados o en *bursts*) de mayor duración que los obtenidos solo con ACh 100 μ M (Figura II.9, trazo superior). Al utilizar Y674-R685 (1 pM o 10 μ M) como agonista junto a 5-HI 2 mM en la pipeta se obtuvieron registros con actividad del canal $\alpha 7$, aunque, similar a lo que ocurrió con PNU-120596, la frecuencia de los episodios de activación fue notablemente menor en comparación con la provocada por ACh y 5-HI (Figuras II.9 y II.10). En la condición Y674-R685 10 μ M junto a 5-HI 2 mM los 3 sellos obtenidos fueron activos, pero visualmente se pudo notar que la frecuencia y duración de los episodios de activación fue menor con respecto al control con ACh. Al

cuantificar las duraciones medias de las aperturas aisladas y *bursts* se demostró una disminución estadísticamente significativa en ambos parámetros ($\tau_{open} = 0,73 \pm 0,07$ ms; $p = 0,0114$; y $\tau_{burst} = 0,85 \pm 0,13$ ms; $p = 0,005$; $n = 3$; $N = 1$) en comparación al control con ACh y 5-HI ($\tau_{open} = 1,28 \pm 0,35$ ms; y $\tau_{burst} = 3,60 \pm 1,29$ ms; $n = 37$; $N = 11$; Figura II.9).

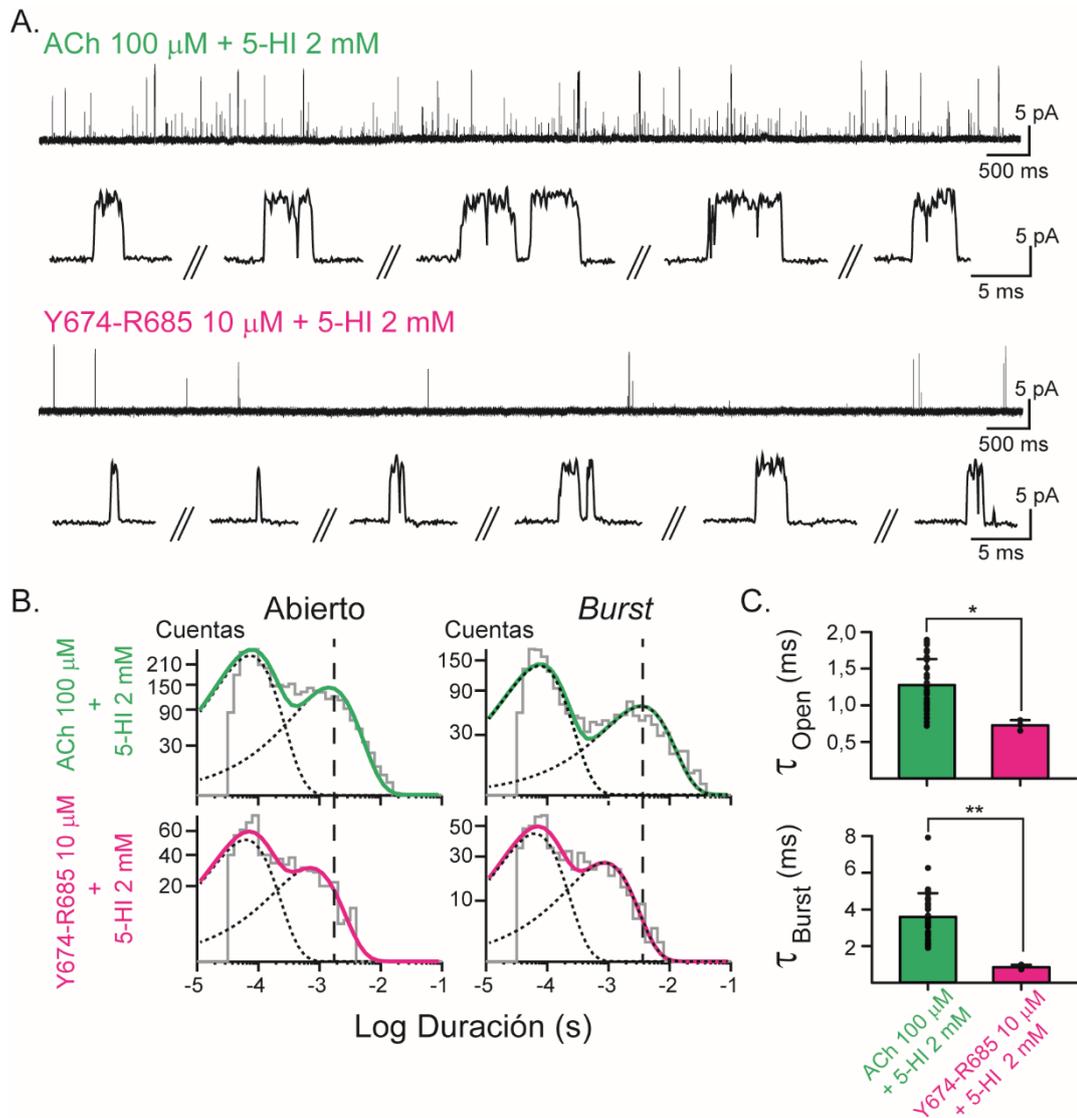


FIGURA II.9. Corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por Y674-R685 10 μ M en presencia de 5-HI 2 mM.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ en presencia de 5-HI 2 mM activadas por ACh 100 μ M o por Y674-R685 10 μ M obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. Para cada condición se muestran los trazos de los canales en dos escalas temporales diferentes. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos

de cada histograma. Las líneas discontinuas verticales muestran cómo estas duraciones medias son diferentes entre Y674-R685 10 μM y ACh 100 μM .

(C) Gráficos de barras de las duraciones de los componentes más lentos del histograma de estado abierto (τ_{open}) y de *bursts* (τ_{burst}) para cada condición. Los datos se muestran como el promedio \pm SD ($n = 37$; $N = 11$ para ACh; y $n = 3$; $N = 1$ para Y674-R685). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones con ACh (control) y con Y674-R685 (el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$).

Con Y674-R685 1 pM y 5-HI 2 mM, el 83,3 % de los sellos mostró actividad, pero la frecuencia de los eventos fue muy baja ($n = 18$; $N = 3$). Por ello, se recurrió a combinar todos los registros para construir un único histograma de estado abierto y de *bursts*. Las duraciones obtenidas de los mismos fueron: $\tau_{\text{open}} = 1,1$ ms y $\tau_{\text{burst}} = 4,2$ ms, valores similares a los del control con ACh y 5-HI (Figura II.10).

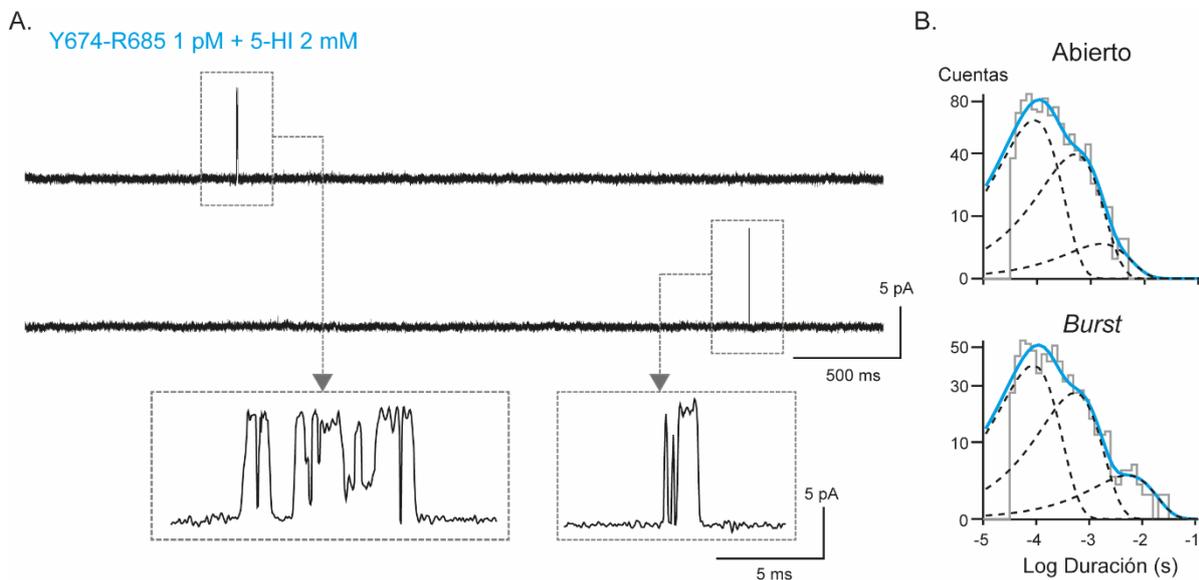


FIGURA II.10. Corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por Y674-R685 1 pM en presencia de 5-HI 2 mM.

(A) Registro representativo de canal único de $\alpha 7$ en presencia de 5-HI 2 mM activado por Y674-R685 1 pM obtenido por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. En los recuadros se muestran los canales con mayor amplificación. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas de estado abierto y de *bursts* construidos por la combinación de 18 registros. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos de cada histograma.

Otro aspecto importante a resaltar es que en presencia de 5-HI 2 mM y Y674-R685 10 μM , la duración media de las aperturas aisladas fue similar a la de los *bursts*, indicando que las aperturas de los canales ocurrieron principalmente como eventos aislados en

lugar de los típicos *bursts* que caracterizan a los registros de ACh y 5-HI. Esta disminución en la eficacia de la potenciación del 5-HI a concentraciones altas del fragmento Y674-R685 fue similar a la descrita anteriormente para el PNU-120596.

Como conclusión parcial, se puede decir que el fragmento Y674-R685 de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 activa al receptor $\alpha 7$ solo en presencia de PNU-120596 o 5-HI, pero que el aumento de la concentración de dicho fragmento se acompaña de una disminución en la duración de los episodios de activación. Esto sugiere que Y674-R685, además de actuar como un agonista silente de $\alpha 7$, podría estar ejerciendo cierto tipo de inhibición de la actividad del receptor.

2. Inhibición de la actividad de $\alpha 7$ por el fragmento peptídico Y674-R685 de la glicoproteína S del SARS-CoV-2

En los experimentos anteriores, llevados a cabo para investigar el rol de Y674-R685 como agonista de $\alpha 7$, se observó una disminución de la duración y frecuencia de los canales activados por dicho fragmento. Esto permitió sugerir que, además de actuar como agonista silente de $\alpha 7$, Y674-R685 podría tener un efecto inhibitorio sobre el receptor. Para poder explorar los mecanismos moleculares que median dicho efecto se realizaron registros de canal único de $\alpha 7$ con ACh como agonista con el fin de tener una elevada actividad del canal. La duración de los episodios de activación de $\alpha 7$ evocados por ACh son muy breves y, además, están en el límite de resolución temporal de nuestro sistema de adquisición de datos. Por ello, se decidió utilizar PNU-120596 para incrementar la duración de los eventos y poder detectar reducciones de esos tiempos por efecto de Y674-R685. Los registros de $\alpha 7$ obtenidos en la configuración *cell-attached* con ACh 10 μM y PNU-120596 1 μM en la pipeta mostraron el perfil cinético ya descrito anteriormente, caracterizado por la presencia de *clusters* de gran duración (Figura II.11, trazo superior). La inclusión de Y674-R685 en la pipeta produjo cambios bien marcados en este perfil cinético de una manera dependiente de la concentración (Figura II.11, trazos inferiores y Tabla II.1).

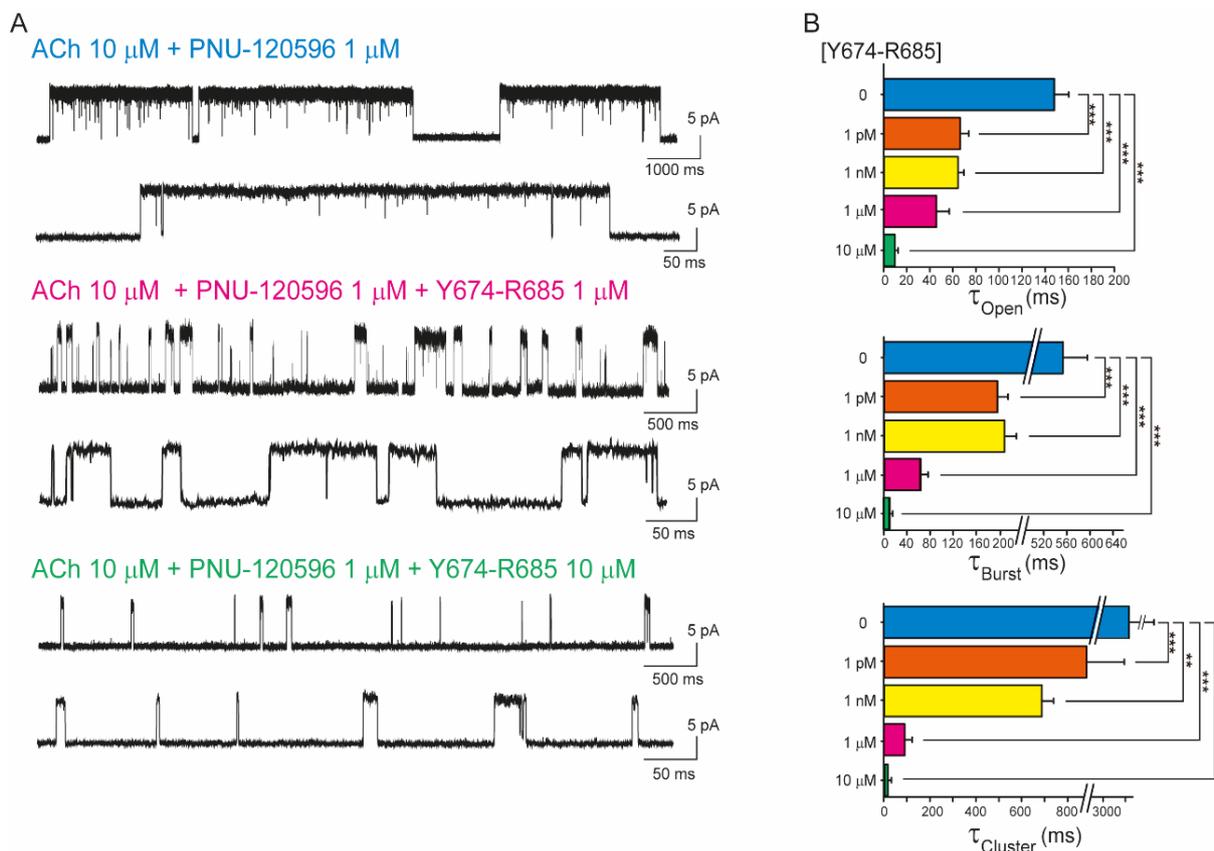


FIGURA II.11. Y674-R685 inhibe las corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh y potenciadas por PNU-120596

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ provocadas por ACh 10 μM y potenciadas por PNU-120596 1 μM en ausencia (control) o presencia de Y674-R685 1 o 10 μM obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. Para cada condición, se muestran los trazos de los canales en dos escalas temporales diferentes. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráficos de barras de las duraciones de los componentes más lentos del histograma de estado abierto (τ_{open}), de *bursts* (τ_{burst}) y de *clusters* (τ_{cluster}) en ausencia (azul) y en presencia de Y674-R685 1 pM (naranja), 1 nM (amarillo), 1 μM (rosa), y 10 μM (verde). Los datos se muestran como el promedio \pm SD (Tabla II.1). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas contra la condición control sin Y674-R685 (el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

| [Y674-R685] | τ_{open} (ms) | τ_{burst} (ms) | $\tau_{cluster}$ (ms) | n/N |
|-------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----|
| - | 148 ± 11 | 550 ± 38 | 3048 ± 516 | 3/1 |
| 1 pM | 66 ± 6*** (p = 0,0000770) | 187 ± 16*** (p = 0,0000109) | 878 ± 161*** (p = 0,000458) | 4/1 |
| 1 nM | 64 ± 3*** (p = 0,000294) | 209 ± 16*** (p = 0,000138) | 684 ± 48** (p = 0,00139) | 3/1 |
| 1 μM | 45 ± 11*** (p = 0,000415) | 63 ± 13*** (p = 0,0000296) | 90 ± 23*** (p = 0,000581) | 3/1 |
| 10 μM | 9,9 ± 2,6*** (p = 0,00000277) | 11 ± 3*** (p = 0,000000841) | 14 ± 4*** (p = 0,0000663) | 4/1 |

TABLA II.1. Inhibición de las corrientes unitarias de $\alpha 7$ por Y674-R685.

Se muestran las duraciones medias de las aperturas aisladas (τ_{open}), de los *bursts* (τ_{burst}) y de los *clusters* ($\tau_{cluster}$) obtenidas de los histogramas correspondientes. Los datos se muestran como el promedio ± SD. “n” indica el número de registros para cada condición; “N” indica el número de transfecciones diferentes para cada condición; y “p” corresponde al valor de p resultante de la prueba t-Student a dos colas en la que cada parámetro se comparó contra el control en ausencia de Y674-R685 (el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: p < 0,01**, p < 0,001***).

Si bien las duraciones de las aperturas aisladas, de los *bursts* y de los *clusters* se vieron notablemente reducidas por acción de Y674-R685, la duración de los *clusters* fue el parámetro más sensible, seguido luego por la de los *bursts*. Con respecto a los registros control con ACh y PNU-120596, la presencia de Y674-R685 1 pM, 1 nM, 1 μM y 10 μM redujo la duración de los *clusters* en un 72 %, 78 %, 97 % y 99 % respectivamente; mientras que la reducción de los *bursts* fue de 66 %, 62 %, 88 % y 98 % respectivamente; y la de las aperturas aisladas fue de 54 %, 57 %, 70 % y 93 % respectivamente. Al ir aumentando la concentración del fragmento Y674-R685, la inhibición se hizo más evidente y, a 10 μM, los *clusters* de larga duración estuvieron ausentes, detectándose solo *bursts* marcadamente más breves que los del control (Figura II.11 y Tabla I.1). A esta alta concentración del péptido, la duración media de las aperturas aisladas fue de $\tau_{open} = 9,9 \pm 2,6$ ms, lo que corresponde a aproximadamente el 7 % de la del control. Esta duración no fue diferente a la de los *bursts* ($\tau_{burst} = 11,2 \pm 3,0$ ms; p = 0,543), lo que indica que la mayoría de las aperturas largas ocurrieron de forma aislada. Además, en esta condición, aunque los *clusters* no se detectaron visualmente, se construyeron los histogramas de *clusters* utilizando un $\tau_{crítico} \sim 10$ -20 ms, que es 20 a 40 veces más largo que el utilizado para los histogramas de *bursts*. Obtenido de esta manera, la duración media de los *clusters* fue de $\tau_{cluster} = 14,1 \pm 4,4$ ms. Este valor no es diferente al de los *bursts* (p = 0,315), lo que confirma la ausencia de los episodios de activación de larga duración típicos de $\alpha 7$ potenciados por PNU-120596 debido a la presencia de Y674-R685 10 μM.

Por otra parte, utilizando los mismos registros de $\alpha 7$ activado con ACh y potenciado con PNU-120596 en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de Y674-R685, se analizó la duración de los tiempos de estado cerrado en función de la concentración del fragmento proteico, a fin de poder profundizar en el mecanismo que subyace al efecto inhibitorio.

Para la condición de control (sin péptido), los histogramas de *estado cerrado* se ajustaron mediante cinco o seis componentes exponenciales. Los tres componentes más breves corresponden a cierres dentro del *cluster* (*intracluster*) y sus duraciones medias fueron constantes entre los diferentes registros (Figura II.12 y Tabla II.2). Los dos o tres componentes cerrados de mayor duración corresponden a cierres que separan *clusters* o aperturas o *bursts* aislados (*intercluster*), y mostraron duraciones variables entre sellos debido a diferencias en los niveles de expresión del receptor. El tiempo crítico ($\tau_{\text{crítico}}$) para definir el *cluster* surge de la intersección entre el último componente de cierre *intracluster* y el primer componente de cierre *intercluster*, y en el control se da entre el tercer y cuarto componente. El componente más breve del histograma de estado cerrado fue el componente mayoritario y corresponde a cierres muy breves entre aperturas que ocurren con alta frecuencia dentro de los *clusters*.

Con el agregado de Y674-R685, y al ir aumentando su concentración, el área relativa del componente más breve disminuyó (desde aproximadamente un 64 % en el control a un 24 % en Y674-R685 10 μM) y los componentes de cierres *intercluster* fueron incrementando su área relativa (Figura II.12 y Tabla II.2). Esto explica la observación previa de que a medida que aumenta la concentración del fragmento proteico los *clusters* disminuyen en número y duración. Menor cantidad de *clusters* y menor duración de los mismos lleva a una disminución del número de cierres *intracluster*, lo que explica la caída del área relativa del componente más breve y el incremento del área relativa de los componentes de cierre *interclusters*. Las comparaciones de los histogramas de estado cerrado entre las condiciones con diferentes concentraciones del fragmento proteico no revelaron ningún componente nuevo de duración constante cuya área aumentara con la concentración de péptido (Figura II.12 y Tabla II.2).

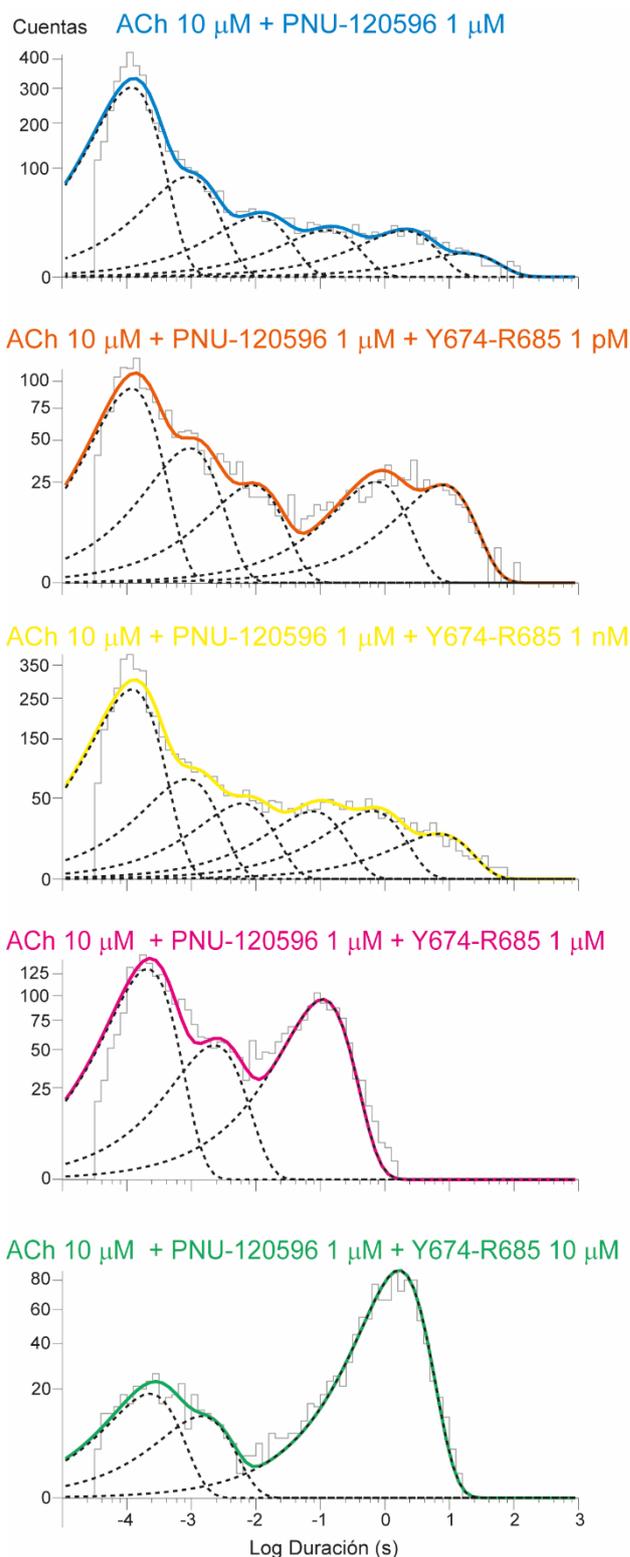


FIGURA II.12. Histogramas de estado cerrado de $\alpha 7$ activado por ACh y potenciado por PNU-120596 en presencia de diferentes concentraciones de péptido.

Histogramas representativos de estado cerrado obtenidos de registros de canales de $\alpha 7$ activados por ACh 10 μ M y potenciados por PNU-120596 1 μ M en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de Y674-R685 (1 pM, 1 nM, 1 μ M y 10 μ M). La duración y el área de todos los componentes para cada condición se muestran en la tabla II.2.

| [Y674-R686] | Cerrado 1 (ms) (%) | Cerrado 2 (ms) (%) | Cerrado 3 (ms) (%) | Cerrado 4 (ms) (%) | Cerrado 5 (ms) (%) |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| - | 0,11 ± 0,01 63 ± 8,4 | 0,90 ± 0,17 20 ± 1,9 | 8,5 ± 1,0 7,6 ± 1,8 | 230 ± 66 6,1 ± 3,8 | 5540 ± 3279 2,9 ± 2,3 |
| 1 pM | 0,14 ± 0,02 48 ± 2,7 | 1,2 ± 0,09 21 ± 1,9 | 11 ± 3,7 9,4 ± 0,3 | 604 ± 310 11 ± 2,2 | 5418 ± 4031 11 ± 0,5 |
| 1 nM | 0,12 ± 0,01 56 ± 5,4 | 1,0 ± 0,25 18 ± 1,9 | 10 ± 4,7 9,9 ± 1,4 | 207 ± 106 11 ± 2,0 | 2354 ± 1845 5,8 ± 2,2 |
| 1 μM | 0,21 ± 0,06 38 ± 5,8 | 3,0 ± 0,61 20 ± 1,4 | 100 ± 19 42 ± 4,4 | | |
| 10 μM | 0,22 ± 0,04 24 ± 7,8 | 2,4 ± 1,2 13 ± 3,2 | 899 ± 641 63 ± 8,7 | | |

TABLA II.2. Duración y área relativa de los componentes obtenidos de los histogramas de estado cerrado de $\alpha 7$ activado por ACh y potenciado por PNU-120596 en presencia de diferentes concentraciones de péptido.

Las corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 10 μM y potenciadas por PNU-120596 1 μM se registraron en ausencia o presencia de Y674-R685 en diferentes concentraciones. La tabla muestra la duración (ms) y el área relativa (%) de cada uno de los componentes del histograma de estado cerrado para las distintas condiciones. Los datos se muestran como el promedio \pm SD. Los “n” y “N” son los mismos para cada condición que los reportados en la tabla II.1.

A fin de dilucidar posibles mecanismos inhibitorios, los resultados se analizaron en una primera instancia sobre la base de un mecanismo de bloqueo de canal abierto simple (Erwin Neher y Henry Steinbach, 1978). Las características de dicho mecanismo son: (i) disminución de la duración de las aperturas aisladas (τ_{open}) en función de la concentración del bloqueador; (ii) aumento dependiente de la concentración en el área porcentual del componente bloqueado; (iii) duración media constante del componente bloqueado a diferentes concentraciones del bloqueador; (iv) aumento de la duración de los *bursts/clusters* ($\tau_{\text{burst/cluster}}$) en función de la concentración del bloqueador (Erwin Neher y Henry Steinbach, 1978). Los registros realizados en presencia de PNU-120596 y ACh mostraron una disminución en la duración de las aperturas aisladas en función de la concentración de Y674-R685, lo que puede sugerir un bloqueo del canal abierto. Sin embargo, también mostraron una disminución en las duraciones de los *bursts* y *clusters* al incrementarse la concentración del fragmento proteico y, además, tampoco mostraron el *flickering* típico de los bloqueadores rápidos de canal abierto (Erwin Neher y Henry Steinbach, 1978). Por último, los histogramas de estado cerrado no revelaron ningún componente nuevo que pueda ser asignado inequívocamente a un período de bloqueo y cuya duración sea constante en las diferentes concentraciones de Y674-R685.

Para obtener más información sobre el mecanismo que impulsa el efecto inhibitor de Y674-R685 sobre $\alpha 7$ activado con ACh y potenciado con PNU-120596, se comparó el perfil de actividad del canal en presencia de MLA, un antagonista competitivo y reversible de $\alpha 7$, con respecto al perfil observado por acción del fragmento de la glicoproteína S. Para este experimento se eligió la estrategia de llenar la punta de la pipeta con la ECS que contiene ACh 10 μM y PNU-120596 1 μM y el resto de la pipeta con la misma solución, pero conteniendo además MLA 100 nM. Esta estrategia permitió seguir en tiempo real los efectos del antagonista durante el registro de los canales. Al comienzo de la grabación se observó el patrón típico de $\alpha 7$ activado por ACh y potenciado por PNU-120596 que comprende un alto grado de actividad del canal y la presencia de *clusters* de larga duración, que incluso se superponen en sellos donde hay más de un receptor bajo el área de membrana delimitado por la pipeta (Figura II.13, trazo superior). Alrededor de los 5 minutos de comenzado el registro, se observó una disminución en la frecuencia de los *clusters*, sin apreciarse alteración en su arquitectura, es decir, en la duración y el número y tipo de cierres *intracluster* (Figura II.13, trazo medio). Gradualmente se evidenció un aumento de la frecuencia y duración de los períodos silentes (cierres *interclusters*), hasta verse suprimida por completo la actividad del canal después de 10 a 15 minutos debido a la presencia de MLA (Figura II.13, trazo inferior). Este efecto no se acompañó de cambios en las duraciones medias de las aperturas aisladas, de los *bursts* y de los *clusters*, a diferencia de lo descrito para Y674-R685. Es decir, la MLA solo ocasionó una caída de la frecuencia de los episodios de activación (hasta su desaparición) sin modificar la duración de dichos episodios. Así, el tipo de inhibición mediada por Y674-R685 difiere de la producida por este antagonista competitivo.

ACh 10 μM + PNU-120596 1 μM + MLA 100 nM

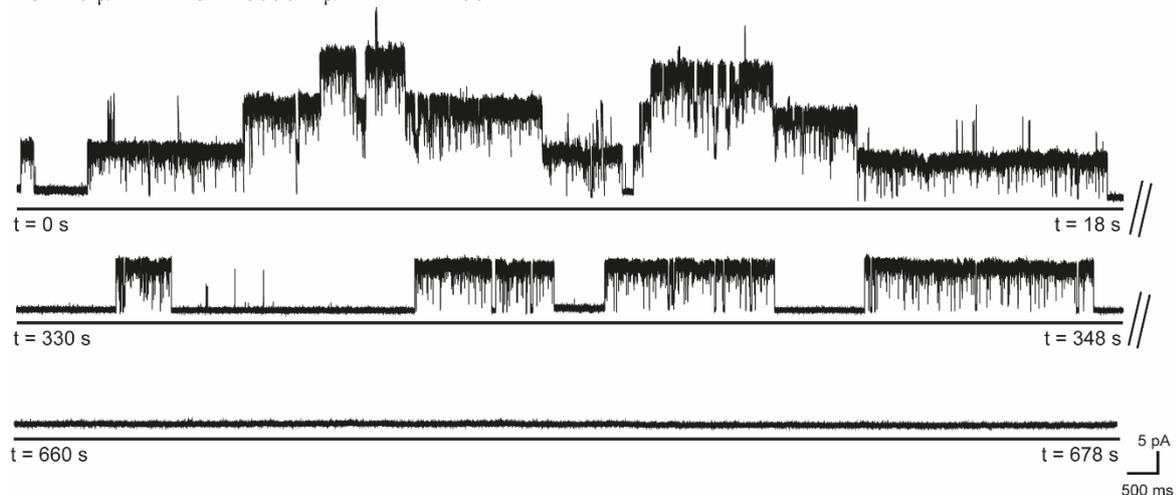


FIGURA II.13. Efecto en tiempo real de MLA sobre los canales unitarios de $\alpha 7$ activados por ACh 10 μM y potenciados por PNU-120596 1 μM .

Registro representativo de corrientes unitarias de $\alpha 7$ obtenido por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* utilizando en la punta de la pipeta ACh y PNU-120596, y en el resto de la misma el agonista y PAM junto al MLA, para así medir en tiempo real el efecto del antagonista sobre los canales. Los trazos corresponden a diferentes tiempos de la misma grabación representativa. Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

Analizados en conjunto, estos resultados obtenidos a nivel de corrientes unitarias sugieren que la región Y674-R685 de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 actúa como un antagonista no competitivo de $\alpha 7$.

Con el fin de obtener más datos que apoyen esta teoría, se realizaron registros de corrientes macroscópicas en ovocitos de *X. laevis* expresando de forma heteróloga el receptor $\alpha 7$ humano mediante la técnica de *voltage-clamp* de dos electrodos. Se determinó el efecto de Y674-R685 en el pico de las corrientes del receptor provocadas por ACh 100 μM (CE_{50}). Se aplicaron concentraciones crecientes de Y674-R685 en conjunto con ACh 100 μM y se midió para cada una el pico de la corriente generada en relación al pico control con ACh 100 μM . Al ir aumentando la concentración del fragmento proteico se fueron reduciendo los picos de las corrientes, aunque no se obtuvo inhibición completa en el rango de concentraciones ensayado (0,1 nM - 30 μM). Las relaciones entre los picos de las corrientes se graficaron en función del logaritmo de la concentración molar de Y674-R685, obteniéndose del gráfico la $\text{CI}_{50} = 1,8 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ($n = 10$; $N = 3$; Figura II.14A).

A continuación, para estudiar si el antagonismo observado era competitivo o no, se realizaron curvas concentración-respuesta, donde la respuesta medida fue la amplitud de la corriente al pico, expresada en relación a la amplitud del pico de corriente máximo obtenido. La curva control se realizó variando la concentración de ACh en el rango 0,1 - 2000 μM (Figura II.14B, curva de trazo negro), mientras que la curva experimental se obtuvo al coaplicar una concentración constante de Y674-R685 (1 μM) con concentraciones crecientes de ACh en el rango 0,1 - 2000 μM (Figura II.14B, curva de trazo rojo). Como se observa en la figura II.14B, en comparación con la curva control (ACh sola), la aplicación conjunta de Y674-R685 1 μM y ACh produjo una reducción en las corrientes máximas disparadas por ACh (I_{max}) en un $30 \pm 4 \%$ ($n = 6$; $N = 2$), es decir, se vio afectada la eficacia de la ACh como agonista. A su vez, también se vio alterada levemente su

potencia, lo que se visualiza por el corrimiento hacia la derecha de la curva, desplazando la CE_{50} de ACh hacia valores mayores: $CE_{50} = 80 \pm 6 \mu\text{M}$ para ACh sola y $CE_{50} = 131 \pm 92 \mu\text{M}$ para ACh y Y674-R685 $1 \mu\text{M}$ ($n = 6$; $N = 2$).

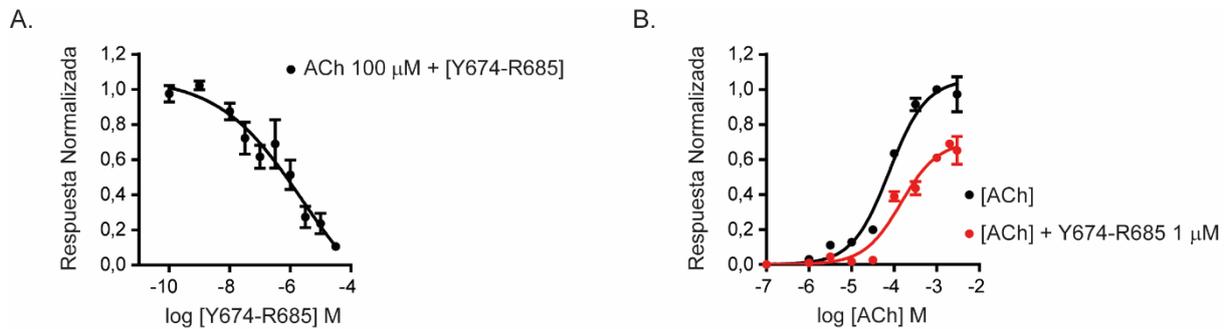


FIGURA II.14. El péptido Y674-R685 inhibe las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ activadas por ACh.

(A) Curva de concentración-respuesta, siendo la respuesta el pico de la corriente provocada por ACh $100 \mu\text{M}$ junto a una concentración dada de Y674-R685 (entre $0,1 \text{ nM}$ a $30 \mu\text{M}$) normalizado al pico de la corriente obtenida con ACh $100 \mu\text{M}$ (control). Cada punto de la curva representa la respuesta normalizada promedio de diez ovocitos \pm SEM.

(B) Curvas de concentración-respuesta, siendo la respuesta el pico de la corriente provocada por ACh a una concentración dada (entre $0,1$ - $2000 \mu\text{M}$) normalizado al pico de la corriente máxima obtenida (control). En negro se muestra la curva control (solo ACh) y en rojo la curva obtenida por coaplicación de Y674-R685 $1 \mu\text{M}$ y diferentes concentraciones de ACh. Cada punto de la curva representa la respuesta normalizada promedio de seis ovocitos \pm SEM.

Los resultados obtenidos a partir de estos ensayos de corrientes macroscópicas en ovocitos de rana más los adquiridos a nivel de canal único en células BOSC23, confirman el rol de Y674-R685 como antagonista no competitivo del receptor nicotínico $\alpha 7$ humano. Este antagonismo, sumado al agonismo silente demostrado previamente y a las simulaciones de dinámica molecular, apoyan la hipótesis de la interacción funcional entre la región Y674-R685 de la glicoproteína S del SARS-CoV-2 y el receptor nicotínico $\alpha 7$ humano.

DISCUSIÓN

La asociación entre el receptor $\alpha 7$ y el SARS-CoV-2 fue planteada al comienzo de la pandemia en la forma de “Hipótesis Nicotínica”, que postula que el virus produce una disfunción del receptor nicotínico conduciendo a una alteración en la vía colinérgica antiinflamatoria (Changeux et al., 2020; Farsalinos, Niaura, et al., 2020; Gonzalez-Rubio et al., 2020) responsable en parte del síndrome hiperinflamatorio que se da en pacientes con la COVID-19 grave (Chen et al., 2020). Varias evidencias y observaciones sugieren una interacción funcional entre el receptor nicotínico $\alpha 7$ y la glicoproteína S del virus (Farsalinos, Eliopoulos, et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Con el objetivo de aportar información experimental que demuestre una interacción funcional entre $\alpha 7$ y la proteína S del SARS-CoV-2, en este capítulo se estudió, mediante técnicas electrofisiológicas, el efecto del fragmento sintético Y674-R685 derivado de la proteína S en la actividad ionotrópica del receptor nicotínico.

Las simulaciones de dinámica molecular muestran que Y674-R685 no solo tiene afinidad por $\alpha 7$, sino que penetra profundamente en el bolsillo de unión a agonista del receptor formando interacciones con residuos de la caja aromática (Figura II.2C). Por ello, teniendo en cuenta estos datos, se exploró la posibilidad de Y674-R685 de actuar como agonista y activar a $\alpha 7$. En primer lugar, se demostró que el péptido sintético es incapaz de activar al receptor actuando por sí solo tanto en registros de corrientes unitarias en células BOSC23 como en corrientes macroscópicas en ovocitos de rana. A continuación, se develó que la presencia de un PAM de $\alpha 7$ junto al fragmento Y674-R685 permitía detectar respuestas microscópicas y macroscópicas del receptor.

Como se mencionó en la introducción de la tesis, los PAM de $\alpha 7$ se clasifican en dos tipos (I y II) en base al mecanismo molecular por el cual inducen la potenciación. El fragmento Y674-R685 es capaz de activar a $\alpha 7$ en presencia de ambos tipos de PAM (5-HI de tipo I, y PNU-120596 de tipo II), pero esta activación es mucho menos eficaz que la obtenida con ACh. A nivel de corrientes macroscópicas, solo el 30 % de los ovocitos ensayados evidenció respuestas al ser activados con Y674-R685 y PNU-120596, y estas respuestas fueron considerablemente menores a las obtenidas en los mismos ovocitos por la combinación de ACh y PNU-120596 (Figura II.5). De la misma manera, no todos los sellos obtenidos a nivel de canal único con diferentes concentraciones de Y674-R685 y PNU-120596 mostraron actividad del canal $\alpha 7$, y cuando lo hicieron, la frecuencia de los

episodios de activación fue marcadamente menor a la que se obtuvo con ACh y PNU-120596 (Figura II.6). El mismo patrón se evidenció en los registros en los que el PAM fue 5-HI (Figura II.9), e incluso, a concentraciones bajas del péptido la actividad del canal fue extremadamente baja (Figura II.10), poniendo en evidencia la diferencia de potencia entre estos tipos de PAM.

Si bien para definir a un agonista del receptor $\alpha 7$ se ha considerado la respuesta ionotrópica, se han encontrado ligandos con una eficacia casi nula con respecto a la activación del canal iónico, pero con la capacidad de llevar al receptor hacia el estado desensibilizado no conductor, activando vías de señalización intracelular por mecanismos metabotrópicos. Estos ligandos, que no provocan la apertura del canal de $\alpha 7$ pero que aparecen como agonistas en presencia de un PAM, se han denominado recientemente como agonistas silentes (Blunt y Dougherty, 2019; Papke et al., 2015; Papke y Lindstrom, 2020). Los resultados obtenidos en este capítulo de tesis han demostrado que Y674-R685 es capaz de activar al receptor $\alpha 7$ en un amplio rango de concentraciones, pero solo en presencia de un PAM, es decir, este fragmento proteico actúa como un agonista silente. Como se comentó, este tipo de ligandos puede ocasionar desensibilización del receptor sin activarlo y de esta manera provocar respuestas metabotrópicas de $\alpha 7$, que incluyen la liberación de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares y la activación de vías de transducción de señales (Bouzat et al., 2018; Egea et al., 2015; Y.-Z. Guan et al., 2015; Kabbani et al., 2013). Se requieren más estudios para responder interrogantes importantes que se plantean sobre si el fragmento S y/o la proteína S entera modifican las respuestas metabotrópicas de $\alpha 7$, cómo lo hacen, y cuál es el impacto en la fisiopatología de la COVID-19.

El sitio ortostérico de unión a agonista de $\alpha 7$ se encuentra en el ECD. Es una cavidad formada por la interfaz entre los ECD de dos subunidades adyacentes. La capacidad del fragmento Y674-R685 de activar $\alpha 7$ (en presencia de un PAM) es consistente con los datos obtenidos de simulaciones de dinámica molecular que predicen que este fragmento puede unirse directamente al sitio de unión a agonista del receptor, llevando en algunas conformaciones al *loop C* a la posición semi-cerrado (Oliveira et al., 2021). Cuando el agonista ortostérico se une a su sitio, el *loop C* se cierra tapando al agonista, un evento asociado con la apertura del canal (Mukhtasimova et al., 2009). El cierre del *loop C* ayuda al anclaje del agonista unido al sitio ortostérico. Se ha sugerido que los agonistas completos inducen conformaciones más compactas del *loop C*, mientras que los

antagonistas y los agonistas parciales producen un cierre incompleto o lo previenen (Brams et al., 2011; Hansen et al., 2005; Hibbs et al., 2009). Las simulaciones de dinámica molecular de Y674-R685 unido a $\alpha 7$ identificaron al grupo guanidinio del residuo arginina 682 (R682) de la proteína S como el punto de anclaje al receptor $\alpha 7$ (Figura II.2C), formando fuertes interacciones con varios residuos aminoacídicos que forman el bolsillo de unión al ligando (Oliveira et al., 2021). Estas simulaciones también mostraron que, cuando se une a $\alpha 7$, el fragmento Y674-R685 de la proteína S adopta muchas conformaciones diferentes dentro del bolsillo de unión, que van desde configuraciones muy compactas hasta otras completamente extendidas. Algunos de estos modos de unión permiten la formación de las interacciones claves necesarias para activar el receptor, mientras que otros no (Figura II.15).

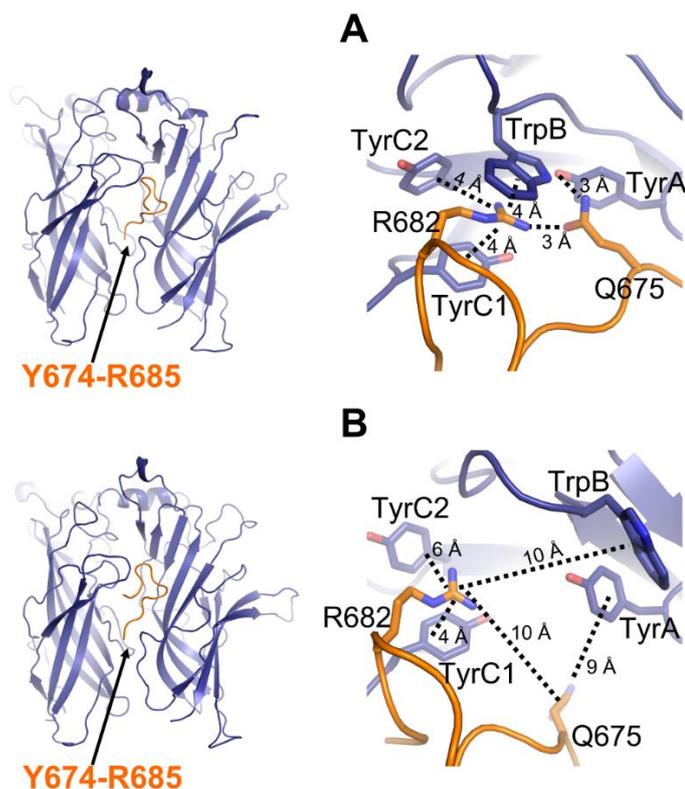


FIGURA II.15. Ejemplos de conformaciones adoptadas por Y674-R685 cuando se une a $\alpha 7$ obtenidas de simulaciones de dinámica molecular.

Las simulaciones de dinámica molecular de Y674-R685 unido a $\alpha 7$ arrojan una elevada probabilidad de unión (Oliveira et al., 2021). Se muestran dos conformaciones provenientes de estas simulaciones en las cuales las interacciones con residuos aromáticos conservados (TrpB, TyrC1, TyrC2 y TyrA) están presentes (A) o ausentes (B). Las representaciones de la izquierda muestran la vista general del complejo Y674-R685/ $\alpha 7$, mientras que las de la derecha son una vista ampliada del sitio de unión a agonista mostrando las interacciones (líneas punteadas)

entre R682 y Q675 y los anillos aromáticos de TrpB (W171), TyrC1 (Y210), TyrC2 (Y217) y TyrA (Y115). El receptor $\alpha 7$ y el fragmento Y674-R685 están coloreados en azul oscuro y naranja, respectivamente.

De los cinco sitios de unión ortostéricos idénticos que tiene el receptor $\alpha 7$, solo se requiere la ocupación de uno para provocar la máxima activación del canal, lo cual es de gran importancia para su papel en el mecanismo de transmisión extrasináptica (N. Andersen et al., 2013b). Por lo tanto, podría ser posible que la ocupación de los sitios de unión por el fragmento Y674-R685 en múltiples orientaciones, algunas de las cuales no pueden desencadenar la activación, pueda contribuir a su baja eficacia comparada con ACh, como se ha descrito anteriormente para los agonistas parciales (Hibbs et al., 2009). Alternativamente, el cierre parcial del *loop C* en presencia de Y674-R685 (Oliveira et al., 2021) observado en algunas de las simulaciones también podría reducir la eficacia para la apertura del canal (Figura II.16).

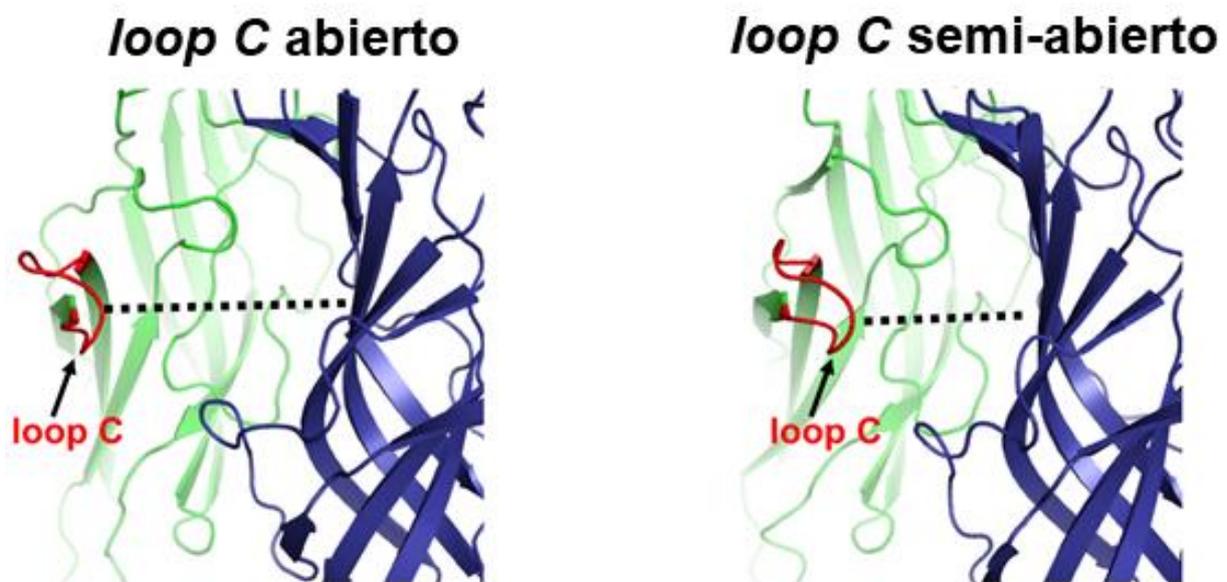


FIGURA II.16. Ejemplos de conformaciones abierta y semi-abierta del loop C.

Las conformaciones abierta y semi-abierta del *loop C* fueron obtenidas de simulaciones de dinámica molecular del complejo Y674-R685/ $\alpha 7$ (Oliveira et al., 2021). El *loop C* está resaltado en rojo, y las subunidades que aportan la cara principal y complementaria del sitio de unión a agonista del receptor $\alpha 7$ están coloreadas en verde y azul oscuro, respectivamente. El fragmento Y674-R685 se omitió por simplicidad.

Los registros de canal único obtenidos en los experimentos en los cuales se demostró que $\alpha 7$ puede ser activado por Y674-R685 en presencia de un PAM, evidenciaron no solo reducida actividad del canal, atribuible a la baja eficacia como

agonista, sino también una disminución en la duración de los episodios de activación. Esto permitió sugerir que dicho fragmento, además de actuar como agonista de $\alpha 7$, podría tener un efecto inhibitorio del receptor. La actividad del canal en presencia de Y674-R685 1 pM y PNU-120596 1 μ M fue de baja frecuencia, pero cinéticamente indistinguible de la provocada por ACh con el mismo PAM, es decir, la arquitectura y duración de los episodios de activación en *cluster* fue similar en ambas condiciones. A medida que aumentó la concentración del fragmento, se vio incrementada la frecuencia de los episodios de activación, pero su duración se tornó progresivamente más breve hasta no detectarse *clusters* de larga duración en la concentración más alta ensayada (10 μ M) (Figura II.7). Lo mismo sucedió en los registros donde se utilizó como PAM al 5-HI. En este caso, con la concentración más baja de Y674-R685 (1 pM), las duraciones de las aperturas aisladas y de los *bursts* fueron similares a las obtenidas con ACh como agonista. No fue posible aplicar el test estadístico correspondiente para la contrastación debido a que solo se cuenta con un único valor de cada parámetro ya que fue necesario juntar todos los canales presentes en 18 sellos diferentes para construir un único histograma de estado abierto y de *bursts* (Figura II.10). Por otro lado, con la concentración más alta del péptido (10 μ M), las duraciones de los episodios de activación fueron significativamente menores que las del control con ACh (Figura II.9). Una explicación posible es que este fenómeno observado con ambos PAM es el resultante de los dos efectos que ejerce Y674-R685 sobre $\alpha 7$: (i) a concentraciones bajas no hay efecto inhibitorio pero la frecuencia de los eventos es baja por ser un agonista débil; (ii) al ir aumentando la concentración, el agonismo se hace más notorio y por ello se observa mayor número de episodios de activación, pero al mismo tiempo se hace evidente el efecto inhibitorio que se visualiza como una reducción en la duración de dichos episodios.

Para confirmar este efecto inhibitorio y no tener el problema de la pobre actividad del canal a concentraciones bajas del fragmento, se llevaron a cabo los experimentos en los que el agonista fue la ACh. Los canales activados por ACh y potenciados por PNU-120596 sufrieron una clara reducción de su duración por acción de Y674-R685 que fue dependiente de la concentración. Al ir aumentando la concentración del fragmento, se notó un drástico cambio en la arquitectura de los episodios de activación que se evidenció por una reducción de las duraciones de las aperturas aisladas, de los *bursts* y de los *clusters* (Figura II.11), llevando incluso a la desaparición de estos últimos en la concentración más alta ensayada (10 μ M).

Estos cambios en el patrón de actividad del canal fueron completamente diferentes a los mediados por MLA, lo que sugiere diferentes mecanismos para ejercer el antagonismo. Este antagonista competitivo y reversible de $\alpha 7$, no modificó el perfil cinético del receptor activado con ACh y potenciado con PNU-120596, sino que ocasionó una reducción gradual de los episodios de activación hasta su desaparición por completo del registro al cabo de aproximadamente 10 minutos (Figura II.13).

Los resultados obtenidos de los experimentos a nivel de corrientes macroscópicas en ovocitos de rana respaldan un mecanismo de inhibición no competitiva ejercida por el fragmento de la proteína S. En la curva de concentración-respuesta de ACh, la presencia de Y674-R685 1 μM produjo una reducción del 30 % en las corrientes máximas y también un desplazamiento de la curva hacia la derecha incrementando la CE_{50} (Figura II.14B). Es decir, el péptido sintético disminuyó la eficacia y la potencia de la ACh como agonista de $\alpha 7$. La curva de concentración-respuesta de Y674-R685 (Figura II.14A) permitió calcular que el péptido inhibe las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM con una CI_{50} en el rango micromolar bajo ($\sim 2 \mu\text{M}$). Como se comentó en la introducción de este capítulo de tesis, los péptidos correspondientes a una región con homología a neurotoxinas de la glicoproteína del virus de la rabia inhiben las respuestas macroscópicas de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ con valores de CI_{50} en el rango micromolar alto (Hueffer et al., 2017).

De la misma forma que sucede con el fragmento Y674-R685, varios compuestos con estructuras muy diversas tienen efectos duales opuestos sobre nAChR, incluido $\alpha 7$, al actuar como agonistas y antagonistas no competitivos (Fabiani et al., 2018; Lasala et al., 2019; Pereira et al., 2002). Los sitios alostéricos pueden estar ubicados en diferentes dominios del receptor, incluidos el ECD y el TMD, e incluso en el poro del canal (Chatzidaki y Millar, 2015; C. J. B. daCosta et al., 2011; Spurny et al., 2015; Young et al., 2008a). En el caso de Y674-R685 queda por determinar el/los sitio(s) desde el que ejerce la inhibición y también cuál es el mecanismo preciso. El principal cambio observado a nivel de canal único es la disminución de la duración del *cluster* hasta tal punto que a una concentración 10 μM del péptido ya no se detectan *clusters* y solo se observan breves *bursts* o aperturas aisladas. Tampoco se detecta un nuevo componente del histograma de tiempos de estado cerrado que se corresponda inequívocamente al componente de bloqueo. Por lo tanto, los cambios en la actividad del canal en función de la concentración del fragmento peptídico son inconsistentes con su acción como un simple bloqueador rápido de canal abierto

(Erwin Neher y Henry Steinbach, 1978). Las explicaciones alternativas para los cambios observados pueden ser que: (i) el péptido actúa como un bloqueador de canal abierto muy lento y, por lo tanto, no se pueden distinguir los cierres correspondientes al bloqueo; (ii) el canal bloqueado puede cerrarse; (iii) el péptido bloquea los canales cerrados, como se ha descrito para muchos bloqueadores de nAChR (Bouzat y Barrantes, 1996; Dilger et al., 1997; Dilger y Bretth, 1991). Además, no se puede descartar que el péptido actúe por más de un mecanismo a la vez ni tampoco el hecho de que pueda estabilizar estados desensibilizados.

La interacción identificada entre el péptido Y674-R685 y $\alpha 7$ se vuelve importante debido a la creciente evidencia que muestra la presencia de proteínas S y S1 libres en los fluidos corporales. La fuente de estas proteínas en plasma se desconoce con certeza. Se ha propuesto que después de la escisión por furina puede haber fuga de proteínas S1 durante la morfogénesis viral (Letarov et al., 2021; L. Zhang et al., 2020). Además, el daño tisular podría conducir a la aparición en plasma de proteína S entera y de fragmentos derivados de su degradación (Ogata et al., 2020). Por otro lado, también se ha planteado la hipótesis de que dentro de la región del marco de lectura abierto de la proteína S, la ARN polimerasa viral puede traducir pequeños péptidos neurotóxicos por medio de un "mecanismo de salto" ya demostrado en otros coronavirus (Cafiero et al., 2021).

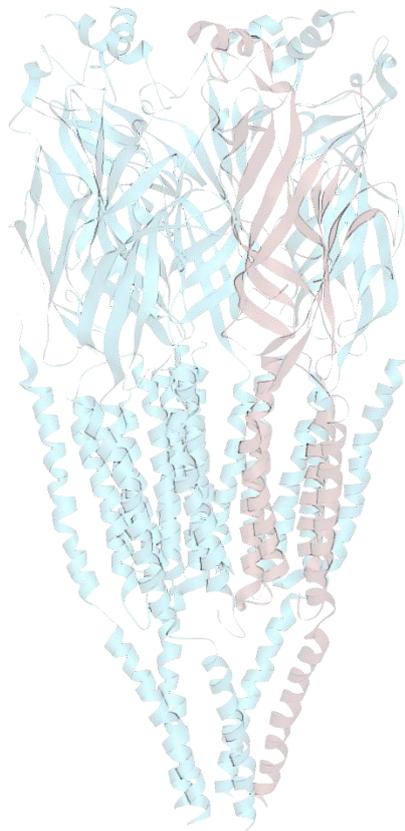
Los hallazgos que se han mostrado en este capítulo se suman al creciente cuerpo de evidencia de que la proteína S libre puede contribuir a la patogénesis de la COVID-19. Los procesos que se cree que son inducidos por esta glicoproteína incluyen trombosis y coagulación sanguínea (Zheng et al., 2021), anomalías en la función renal (George et al., 2021), disfunción de las células endoteliales vasculares por regulación a la baja de la ACE2 (Lei et al., 2021), y respuestas proinflamatorias exacerbadas a través de cascadas de señalización tipo *toll-like 2* en macrófagos (Shirato y Kizaki, 2021). Se ha demostrado que la activación de $\alpha 7$ en el sistema inmune protege de la producción excesiva de citoquinas proinflamatorias (Rosas-Ballina et al., 2008) y, por lo tanto, una disfunción de este receptor da como resultado una sobreproducción de dichas citoquinas conduciendo a un mayor daño tisular (Parrish et al., 2008). En un trabajo reciente se planteó la hipótesis de que en macrófagos la acción antagónica del SARS-CoV-2 sobre $\alpha 7$ determina una desregulación del mecanismo de polarización y una permanencia de los macrófagos de tipo M1, con el consiguiente aumento de la concentración de citoquinas inflamatorias (Tanmay et al., 2021). La inexistencia de PAM endógenos de $\alpha 7$ permite sugerir que el

principal efecto del péptido Y674-R685 a nivel fisiológico sería la inhibición del receptor. Esta acción antagónica explicaría, por lo tanto, la "tormenta de citoquinas" y el síndrome hiperinflamatorio observado en varios pacientes con la COVID-19. Esto plantea la posibilidad de que los receptores nicotínicos $\alpha 7$ puedan estar involucrados en parte de la fisiopatología asociada a la COVID-19 y abre la puerta a una mayor exploración en el futuro. En particular sería interesante realizar ensayos con variantes del SARS-CoV-2, como por ejemplo la variante delta que posee una mutación en la región aquí estudiada de la proteína S (P681R).

Analizados en conjunto, los datos experimentales expuestos en este capítulo proporcionan evidencia molecular que permite concluir la existencia de una interacción funcional directa entre el receptor nicotínico $\alpha 7$ humano y el péptido sintético correspondiente a la región Y674-R685 de la glicoproteína S del SARS-CoV-2. Esta interacción, que tiene lugar dentro del rango de concentración picomolar a micromolar, da como resultado un efecto dual que comprende activación en presencia de un PAM (agonismo silente) y antagonismo no competitivo.

CAPÍTULO III

MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR $\alpha 7$ POR CANNABIDIOL



INTRODUCCIÓN

1. *Cannabis sativa*, fitocannabinoides y sistema endocannabinoide

La planta herbácea *Cannabis sativa*, conocida vulgarmente como marihuana, ha sido utilizada durante miles de años con fines recreativos, religiosos y medicinales. Es mundialmente usada como una droga recreativa debido a su habilidad para inducir estados psicológicos y eufóricos en las personas que la ingieren o fuman (Watkins, 2019). Por otra parte, también tiene una larga y extensa historia como planta medicinal (E. B. Russo, 2007). El primer registro se encuentra en la farmacopea más antigua del mundo, el Pen-ts'ao ching (China, 2737 a.C.), además hay evidencia de su aplicación para el tratamiento de la epilepsia en Sumeria (1800 a.C) (Castillo-Arellano et al., 2023; Friedman y Devinsky, 2016).

Se han aislado más de 545 sustancias distintas de las especies de *Cannabis*, que incluyen: terpenoides, flavonoides, alcaloides, lignanos, ácidos grasos y una gran cantidad de compuestos (~ 120) que son exclusivos de la planta y se denominan fitocannabinoides. Estos últimos son una familia de moléculas que tienen un esqueleto terpenofenólico de 21 carbonos, de los cuales los más abundantes y mejor estudiados son el trans- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD) (Figura III.1) (Castillo-Arellano et al., 2023; Friedman y Devinsky, 2016).

El THC es el principal compuesto psicoactivo responsable de los efectos conductuales inducidos por el consumo del extracto de *C. sativa* (cannabis). El estudio de esta molécula condujo al descubrimiento de un sistema modulador ampliamente distribuido en todo el cuerpo y sobre todo en SN, identificado como el sistema endocannabinoide. El mismo está compuesto por: (i) una red de receptores de cannabinoides (CBR, *CannaBinoid Receptor*) expresados en todo el cuerpo, de los cuales hay dos tipos, CB1R (*CannaBinoid Receptor type 1*) y CB2R (*CannaBinoid Receptor type 2*); (ii) los ligandos endógenos (endocannabinoides), como la anandamida (AEA, *N-ArachidonoylEthanolAmine*) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG; *2-Arachidonoyl Glycerol*); y (iii) las enzimas necesarias para la síntesis y degradación de los endocannabinoides, incluida la amida hidrolasa de ácidos grasos y la monoacilglicerol lipasa (H. C. Lu y Mackie,

2021). El segundo fitocannabinoide más abundante del cannabis, el CBD, a diferencia del THC, no induce intoxicación y no muestra el perfil característico de una droga de abuso.

La mayoría de los efectos psicoactivos del cannabis se deben al THC, que se une con gran afinidad y activa los CBR, teniendo una afinidad más elevada por el CB1R que por el CB2R (Mechoulam, 2016). Por otro lado, el CBD tiene baja afinidad por los sitios ortostéricos de ambos receptores, y actúa como modulador alostérico negativo del CB1R en el rango nanomolar, mientras que se comporta como agonista parcial del CB2R (Vitale et al., 2021).

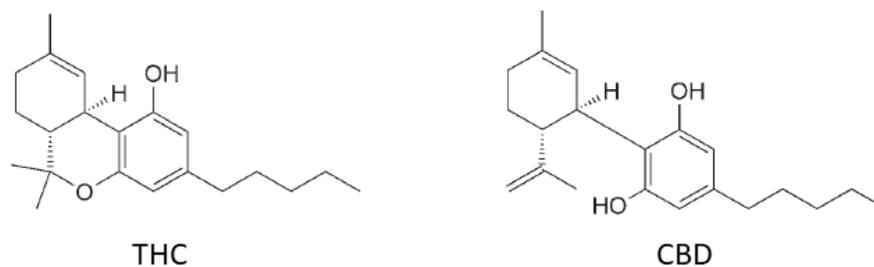


FIGURA III.1. Estructuras químicas del THC y del CBD. Modificado de (Mechoulam et al. 2007).

2. Uso terapéutico de los cannabinoides

En los últimos años ha resurgido fuertemente el interés en la planta por el potencial terapéutico de los fitocannabinoides para el tratamiento de diversas condiciones médicas como dolor, cáncer, desórdenes neurológicos y neurodegenerativos (Soderstrom et al., 2017; Vitale et al., 2021; Watkins, 2019). El CBD es el compuesto más atractivo desde el punto de vista farmacéutico ya que, a diferencia del THC, no produce efectos psicoactivos (Izzo et al., 2009; Mechoulam et al., 2007; Pertwee et al., 2010; Scuderi et al., 2009). Un gran número de estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que el CBD puede ser usado en el tratamiento de diversas condiciones neurológicas como dolor neuropático, epilepsia, daño cerebral por accidente cerebrovascular, entre otras (Hill et al., 2012; Izzo et al., 2009; Peng et al., 2022; Scuderi et al., 2009; Vitale et al., 2021). En varios países se ha legalizado el uso de terapias basadas en el CBD para el tratamiento de la epilepsia y otras condiciones médicas en niños y adultos (Abu-Sawwa et al., 2020; Arzimanoglou et al., 2020; Friedman y Devinsky, 2016; Vitale et al., 2021). Recientemente el CBD ha sido aprobado por la administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos y la Agencia Europea de Medicamentos como fármaco antiepiléptico para el tratamiento de pacientes

con síndromes de Dravet y Lennox-Gastaut afectados por episodios de epilepsia refractaria (Vitale et al., 2021). Actualmente hay ensayos clínicos en curso para el uso de CBD en otras condiciones como autismo (Aran et al., 2021; Pretzsch et al., 2019) y esquizofrenia (McGuire et al., 2018).

3. Acciones del CBD independiente de los CBR

Debido a que el CBD tiene muy baja afinidad por los CBR, se sugiere que no interacciona directamente con el sistema endocannabinoide salvo a concentraciones muy altas (Ibeas Bih et al., 2015; McPartland et al., 2015). Por ello, se piensa que sus efectos benéficos son mediados por acción sobre otros blancos moleculares, lo que genera una urgente necesidad de establecer cuáles son, no solo para explotar estos beneficios sino también para conocer posibles efectos adversos. Se han propuesto muchos y diversos blancos entre los que se incluyen receptores ionotrópicos y metabotrópicos, otros canales iónicos, enzimas, transportadores y estructuras celulares proteicas y no proteicas (de Almeida y Devi, 2020; Ibeas Bih et al., 2015; Peng et al., 2022; Soderstrom et al., 2017; Vitale et al., 2021; Watkins, 2019). Entre los receptores que son blanco del CBD se encuentran algunos pertenecientes a la familia de los pLGIC, como por ejemplo los GlyR subtipos $\alpha 1$ y $\alpha 1\beta$ (Ahrens et al., 2009), el 5-HT_{3A}R (Xiong, Koo, et al., 2011; Z. Yang et al., 2008), los GABA_AR (Bakas et al., 2017) y el nAChR $\alpha 7$ (Mahgoub et al., 2013).

4. Los pLGIC como blancos de los cannabinoides

Existen varios trabajos que muestran la modulación de los pLGIC por fitocannabinoides, endocannabinoides y cannabinoides sintéticos por un mecanismo independiente de los CBR (Soderstrom et al., 2017; Vitale et al., 2021).

Los 5-HT_{3A}R son inhibidos alostéricamente de manera independiente de los CBR por los fitocannabinoides CBD y THC; por el endocannabinoide AEA; y por varios cannabinoides sintéticos (Barann et al., 2002; Fan, 1995; Oz et al., 2002; Xiong, Koo, et al., 2011; K. H. Yang et al., 2010). Se ha demostrado que tanto el CBD como el THC ejercen su efecto inhibitorio por un mecanismo que involucra un incremento en la velocidad de desensibilización del receptor sin afectar su cinética de activación (Xiong, Koo, et al., 2011). El antagonismo de los cannabinoides sobre los 5-HT_{3A}R puede explicar, al menos

en parte, su eficacia para prevenir las náuseas y vómitos en el tratamiento quimioterápico (Soderstrom et al., 2017; Vitale et al., 2021).

Los GABA_AR son potenciados por los fitocannabinoides CBD y THC, y por el endocannabinoide 2-AG (Bakas et al., 2017; Baur et al., 2013; Golovko et al., 2015; Sigel et al., 2011). Algunos trabajos muestran que la potenciación del 2-AG solo se da si está presente la subunidad $\beta 2$ en los GABA_AR, e identifican aminoácidos fundamentales para observar el efecto localizados en los segmentos M3 y M4 de $\beta 2$, lo que les permite sugerir que el sitio de unión del 2-AG está en las caras enfrentadas de los segmentos M3 y M4 de $\beta 2$ (Baur et al., 2013; Sigel et al., 2011). La actividad potenciadora del CBD en los GABA_AR podría explicar los efectos anticonvulsivos, ansiolíticos y analgésicos de este compuesto (Devinsky et al., 2014), y justifica su uso en pacientes con epilepsia (Abu-Sawwa et al., 2020; Vitale et al., 2021).

Existen varios estudios con resultados contrapuestos en relación al efecto de los cannabinoides sobre los GlyR. Dependiendo del subtipo de receptor y del cannabinoide ensayado, se encuentra en la bibliografía modulación positiva, negativa o ausencia de efecto. Un trabajo afirma que la AEA y el 2-AG modulan negativamente las corrientes macroscópicas evocadas por Gly en neuronas del hipocampo y cerebelo de rata (Lozovaya et al., 2005), en contraposición, varios estudios en diferentes preparaciones han demostrado que AEA es un PAM de los GlyR (Hejazi et al., 2006; Z. Yang et al., 2008; Yevenes y Zeilhofer, 2011). De la misma forma, el THC, potencia alostéricamente las corrientes de Gly en neuronas del área tegmental ventral de rata y en ovocitos de *X. laevis* expresando GlyR $\alpha 1$ y $\alpha 1\beta$ (Hejazi et al., 2006). La Ser-296 en el M3 de la subunidad $\alpha 1$ y la homóloga en $\alpha 3$ (Ser-307) son críticas para la potenciación por el THC de los GlyR $\alpha 1$ y $\alpha 3$ respectivamente, mientras que los GlyR $\alpha 2$ que carecen de esa Ser son insensibles al fitocannabinoide (Xiong, Cheng, et al., 2011). En lo que respecta a la acción del CBD sobre los GlyR, se ha demostrado que el fitocannabinoide, en el rango micromolar bajo, potencia a los GlyR $\alpha 1$ y $\alpha 1\beta$, pero, más interesante aún, los activa a una concentración 100 μM (Ahrens et al., 2009), siendo indispensable para estos efectos la Ser-267 en el M2 de $\alpha 1$ (Foadi et al., 2010). Además, se ha demostrado que el CBD suprime el dolor inflamatorio y neuropático crónico en roedores (Xiong et al., 2012). A modo de resumen, se puede decir que existe mucha evidencia a favor de un rol potenciador de los cannabinoides sobre los GlyR, lo cual tendría implicancias en hiperplexia y en el tratamiento del dolor neuropático e inflamatorio.

En cuanto al efecto de los cannabinoides sobre los nAChR se ha visto que pueden tener un rol inhibitorio en algunos casos, o carecer de acción en otros. La metanandamida, análogo no hidrolizable de la AEA, inhibe a los nAChR presentes en las neuronas simpáticas postganglionares cardíacas de rata (Baranowska et al., 2008). Por su parte, la AEA disminuye el pico y aumenta la velocidad de desensibilización de las corrientes disparadas por ACh en receptores $\alpha 4\beta 2$ expresados en células SH-EP1 por un mecanismo alostérico e independiente de los CBR (Spivak et al., 2007). Por otro lado, los nAChR $\alpha 7$ expresados en ovocitos de *X. laevis* son inhibidos alostéricamente por la AEA y el 2-AG; mientras que el THC y dos cannabinoides sintéticos (WIN55,212-2 y CP55940) no tienen efectos sobre estos receptores (Oz et al., 2003, 2004). A su vez, el CBD también inhibe por un mecanismo alostérico las corrientes macroscópicas de los nAChR $\alpha 7$ expresados en ovocitos de *X. laevis* o presentes en interneuronas de hipocampo de rata (Mahgoub et al., 2013).

OBJETIVOS

El uso del CBD en diferentes condiciones patológicas se ha expandido ampliamente en los últimos años debido a sus propiedades terapéuticas y a la ausencia de efectos psicoactivos. La baja afinidad del CBD por los CBR sugiere que el sistema endocannabinoide no sería su principal blanco de acción. Para potenciar los efectos benéficos y evitar las consecuencias negativas de un mal uso, es muy importante conocer cuáles son los blancos moleculares del CBD. El objetivo general de este último capítulo de la tesis es estudiar al receptor nicotínico $\alpha 7$ como blanco del CBD, considerando la importancia de dicho receptor en diversas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas. Para ello, por un lado, se utilizarán técnicas electrofisiológicas a nivel de canal único que permitirán investigar en detalle cómo se afecta por acción del CBD la actividad ionotrópica del receptor. Mientras que, la actividad metabotrópica de $\alpha 7$, y su modulación por el CBD, serán estudiadas mediante la medición de los cambios en el nivel de Ca^{2+} intracelular utilizando sondas fluorescentes y microscopía confocal de fluorescencia.

Los objetivos específicos son:

- Determinar el efecto del CBD en el perfil cinético y en la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ a nivel de canal único.
- Evaluar la sensibilidad de las corrientes unitarias de distintos mutantes de $\alpha 7$ al CBD.
- Investigar la acción del THC sobre la cinética y frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$.
- Determinar cómo el CBD modifica la respuesta del aumento de Ca^{2+} intracelular por la activación de $\alpha 7$.

RESULTADOS

1. Efecto del CBD en la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ a nivel de canal único

En esta primera parte del capítulo se estudia el efecto del CBD sobre la actividad ionotrópica de $\alpha 7$. Para ello se utilizan corrientes unitarias del receptor, obtenidas por la técnica de *patch-clamp* en las configuraciones *cell-attached* e *inside-out*, y diferentes formas de aplicación del fitocannabinoide. Además, se utilizan PAM y diferentes mutantes del receptor para descifrar distintos aspectos de la acción del CBD sobre $\alpha 7$.

1.1. El CBD modifica el patrón de activación de $\alpha 7$ a nivel de canal único

En primera instancia, utilizando la configuración *cell-attached*, se procedió a coaplicar en la pipeta ACh 100 μM y CBD 50 μM para registrar la actividad de $\alpha 7$ expresado de forma heteróloga en células BOSC23, y luego comparar este perfil de activación con el control donde solo se aplicó ACh 100 μM . En el 95% (38/40) de los sellos en la condición control se observó buena actividad del canal ($n = 40$; $N = 12$), la cual consiste principalmente en eventos de aperturas breves y aislados y, menos frecuentemente, en *bursts* de corta duración (Figura III.2 trazo superior), como ha sido detallado en el capítulo I de esta tesis. En cambio, en los registros con ACh y CBD, solo se observó actividad del canal en el 70 % (12/17) de los sellos ($n = 17$; $N = 5$), y ésta fue siempre baja, es decir, escasos eventos aislados y *bursts*. Si bien es cierto que la frecuencia de los episodios de activación puede variar entre los diferentes sellos debido a cambios en los niveles de expresión del receptor y a variaciones en el número de receptores presentes en el parche de membrana delimitado por la pipeta, los registros con ACh y CBD mostraron sistemáticamente baja actividad del canal $\alpha 7$ comparado con los controles hechos en paralelo. Otra observación que surgió de estos primeros ensayos con el CBD fue la aparición, al cabo de unos minutos de registro, de episodios de activación de mayor duración y menor amplitud que los presentes en el control con ACh 100 μM (Figura III.2 trazo inferior).

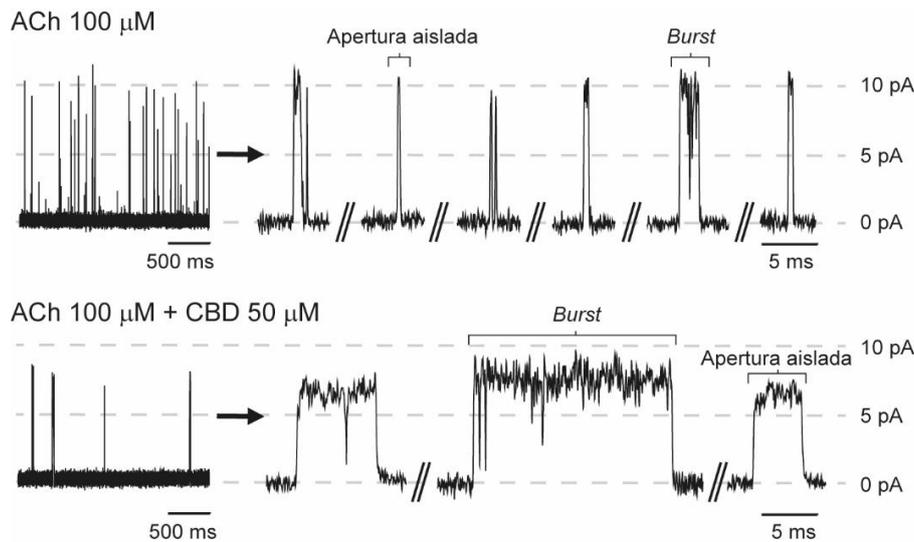


FIGURA III.2. Efecto de la coaplicación de CBD en registros de canal único de $\alpha 7$ activado por ACh.

Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM en ausencia (arriba) y en presencia (abajo) de CBD 50 μM en la solución de la pipeta, obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. Para cada condición, los trazos de los canales se muestran en dos escalas temporales diferentes. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

Estas observaciones iniciales sugirieron que el CBD media al menos dos acciones diferentes sobre $\alpha 7$, por un lado, una inhibición rápida de la actividad del canal, y por el otro, alteraciones en el perfil cinético que se evidencian por la aparición de los episodios de activación de duración prolongada y amplitud reducida. Por lo tanto, para analizar en profundidad y por separado ambos efectos, se diseñaron dos estrategias experimentales diferentes. En la primera se explora la inhibición de la actividad del receptor por el CBD mediante la cuantificación de los cambios en la frecuencia de los episodios de activación en el mismo parche de membrana, y en la segunda, se estudian los cambios por el CBD en las propiedades de activación del receptor a nivel de canal único al medir la duración y la amplitud de los episodios de activación en presencia del fitocannabinoide.

1.1.1. Disminución de la frecuencia de episodios de activación de $\alpha 7$ por CBD

Para poner de manifiesto la reducción de la frecuencia de los canales en función de la concentración de CBD, se utilizó el mismo protocolo aplicado en el capítulo I con los inhibidores y activadores de quinasas. Mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* se registraron las corrientes de canal único generadas por ACh

100 μM en la solución de pipeta. Luego de un tiempo de 2-5 minutos, período definido como “antes”, se agregó a la cápsula el CBD y se continuó registrando la actividad por el mismo tiempo que antes del agregado de la droga, período definido como “después” (Figura III.3A). Para estos experimentos el volumen inicial de la ECS de la cápsula fue de 1,8 mL, y el CBD se agregó diez veces concentrado en 0,2 mL de la ECS, para así lograr la concentración final deseada. La ventaja de esta estrategia es que la variabilidad en la expresión de $\alpha 7$ entre los diferentes registros no afecta al cambio observado en su actividad por acción del CBD, ya que el control y el experimental (expuesto al fitocannabinoide) se obtienen del mismo sello. Como se muestra en la Figura III.3B, el CBD produce una disminución dependiente de la concentración en la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$.

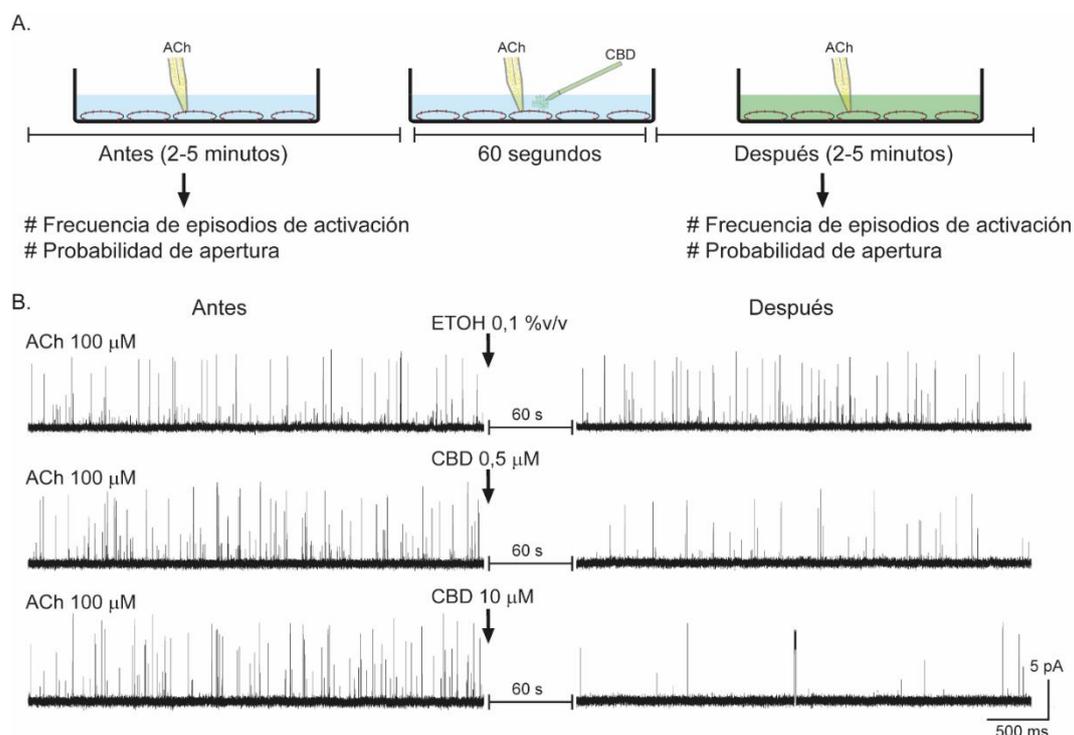


FIGURA III.3. CBD reduce la actividad de $\alpha 7$ de manera dependiente de la concentración.

(A) Esquema ilustrativo del diseño experimental aplicado para estudiar el efecto del CBD sobre el grado de actividad de $\alpha 7$ a nivel de canal único. Los 60 segundos luego de la adición del fitocannabinoide se dejaron para asegurar su correcta difusión y para que se establezca el efecto sobre los canales.

(B) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de etanol 0,1 %v/v (arriba), CBD 0,5 μM (medio) o CBD 10 μM (abajo). Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

Para poder cuantificar este efecto, se midió el número de episodios de activación por unidad de tiempo (frecuencia), antes y 60 segundos después del agregado del CBD o etanol como control (vehículo). Para el análisis se considera que un episodio de activación puede ser tanto una apertura aislada como un *burst*. Se determinó la relación después/antes para cada sello y se promedió entre los diferentes experimentos. El agregado de etanol 0,1 %v/v produjo una leve disminución de la frecuencia de los episodios de activación (relación después/antes = $0,93 \pm 0,10$; $n = 5$; $N = 3$), que fue similar a la obtenida por el agregado de la ECS (relación después/antes = $0,85 \pm 0,04$; $n = 6$; $N = 3$; $p = 0,116$). Esta pequeña reducción se debe a la desensibilización del receptor $\alpha 7$ que ocurre a lo largo del tiempo de registro por la presencia continua de ACh en la pipeta. En cambio, luego de agregado el CBD, se produjo una rápida disminución de la frecuencia de los episodios de activación, que fue estadísticamente significativa a partir de la concentración 500 nM del fitocannabinoide (relación después/antes = $0,56 \pm 0,16$; $n = 5$; $N = 2$; $p = 0,00238$), y que se profundizó con el aumento de su concentración (Figura III.4A). Por ejemplo, la reducción de la actividad del canal fue mayor a 90% con CBD 50 μM (relación después/antes = $0,07 \pm 0,03$; $n = 5$; $N = 3$; $p < 0,001$). El ajuste de los datos con una función logística reveló que CBD inhibe la actividad de $\alpha 7$ con una $\text{CI}_{50} = 0,53 \pm 0,14 \mu\text{M}$ (Figura III.4B).

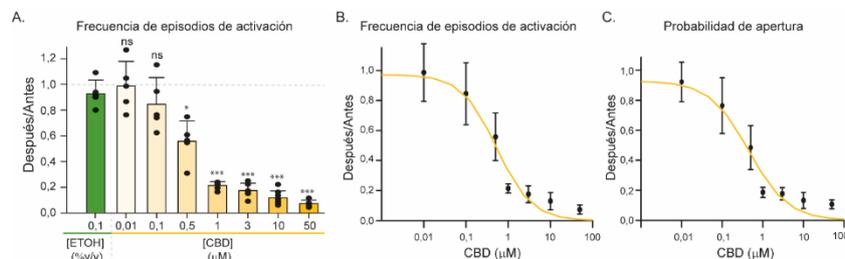


FIGURA III.4. CBD reduce la frecuencia de activación de $\alpha 7$ de manera dependiente de la concentración.

(A) Gráfico de barras que muestra la relación después/antes en la frecuencia de los episodios de activación debido a la adición de etanol 0,1 %v/v o CBD en diferentes concentraciones. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: etanol 0,1 %v/v ($n = 5$; $N = 3$), CBD 0,01 μM ($n = 5$; $N = 3$), CBD 0,1 μM ($n = 5$; $N = 3$), CBD 0,5 μM ($n = 5$; $N = 2$), CBD 1 μM ($n = 6$; $N = 3$), CBD 3 μM ($n = 6$; $N = 2$), CBD 10 μM ($n = 8$; $N = 4$), y CBD 50 μM ($n = 5$; $N = 3$). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones de etanol (control) y CBD (ns: no significativo, $p \geq 0,05$; el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$).

(B) Curva dosis-respuesta de la inhibición de la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$, medida como la relación después/antes, en función de la concentración de CBD. Cada punto

corresponde al promedio de 5-8 experimentos independientes como se describe en **(A)**. La curva se ajustó mediante una función logística, a partir del cual se obtuvo la CI_{50} , expresada como promedio \pm SEM.

(C) Curva dosis-respuesta de la inhibición de la probabilidad de apertura de $\alpha 7$, medida como la relación después/antes, en función de la concentración de CBD. Cada punto corresponde al promedio de 5-8 experimentos independientes como se describe en **(A)**. La curva se ajustó mediante una función logística, a partir del cual se obtuvo la CI_{50} , expresada como promedio \pm SEM.

Otro parámetro importante que se midió en estos experimentos fue la probabilidad de apertura del canal (nP_o), que se expresó como la relación después/antes de la adición de etanol o CBD. De la misma manera que sucedió con la frecuencia de los episodios de activación, la nP_o decayó rápidamente tras el agregado de CBD. El ajuste de la curva de inhibición para la relación después/antes de la nP_o arrojó un valor de $CI_{50} = 0,45 \pm 0,15 \mu M$ (Figura III.4C).

La similitud en los valores de la CI_{50} obtenidos para los dos parámetros medidos (frecuencia y nP_o) sugiere que, al menos en períodos cortos de tiempo luego del agregado de CBD (2-5 minutos), el principal efecto del fitocannabinoide se da sobre la frecuencia de activación del canal y no sobre la duración de los episodios de activación, ya que incrementos en esta duración se verían reflejados en cambios en la nP_o . En tiempos mayores, usualmente luego de 10 minutos de agregado el CBD (sobre todo en concentraciones altas), comienzan a detectarse algunos eventos, de mayor duración y menor amplitud, similares a los observados en los registros obtenidos por coaplicación de ACh 100 μM y CBD 50 μM en la pipeta (Figura III.2). A continuación, con la segunda estrategia experimental diseñada, se analizan con más detalle estos canales y su influencia en la nP_o utilizando los registros en tiempos mayores a 10 minutos de aplicado el CBD.

1.1.2. Cambios en la duración y amplitud de los episodios de activación de $\alpha 7$ por CBD

Para estudiar los eventos de mayor duración y menor amplitud que aparecen en forma tardía por efecto de exposición al CBD, se analizaron los registros de $\alpha 7$ obtenidos con ACh 100 μM y CBD 50 μM en la solución de pipeta como se describió en la figura III.2 (Figura III.5A).

En lo que respecta a la cinética de los episodios de activación (τ_{open} y τ_{burst}), los histogramas de estado abierto y de *bursts* construidos a partir de los registros de ACh y

CBD fueron ajustados con dos componentes cada uno, de manera similar a la condición control (ACh). El $\tau_{\text{crítico}}$, obtenido del histograma de estado cerrado, utilizado en ambas condiciones fue de 0,5 ms. La presencia de CBD 50 μM junto a ACh 100 μM en la solución de pipeta produjo un incremento estadísticamente significativo en la duración media de las aperturas aisladas ($\tau_{\text{open}} = 1,47 \pm 0,38$ ms; $n = 12$; $N = 4$; $p < 0,001$) y en la duración media de los *bursts* ($\tau_{\text{burst}} = 2,36 \pm 0,54$ ms; $n = 12$; $N = 4$; $p < 0,001$) comparado con el control con ACh 100 μM en la pipeta ($\tau_{\text{open}} = 0,30 \pm 0,06$ ms; $\tau_{\text{burst}} = 0,46 \pm 0,12$ ms; $n = 38$; $N = 12$; Figura III.5B).

En cuanto al análisis de la amplitud de los eventos, se presenta el inconveniente de que los registros control de $\alpha 7$ con ACh 100 μM muestran un amplio rango de amplitudes de los canales. Esto se debe a que, en las aperturas muy breves, la resolución de la amplitud es incompleta, y por ello el canal se ve como si tuviera una amplitud menor (N. Andersen et al., 2013a). Sin embargo, si se consideran solamente los eventos de duración mayor a 0,2 ms, se obtiene del histograma de amplitud, una clase homogénea de canales de $10,05 \pm 0,15$ pA ($n = 5$; $N = 4$). La construcción del histograma de amplitud a partir de los registros de ACh 100 μM y CBD 50 μM mostró una amplitud media de $8,36 \pm 0,24$ pA ($n = 12$; $N = 4$), que es significativamente menor a la del control ($p < 0,001$; Figura III.5C).

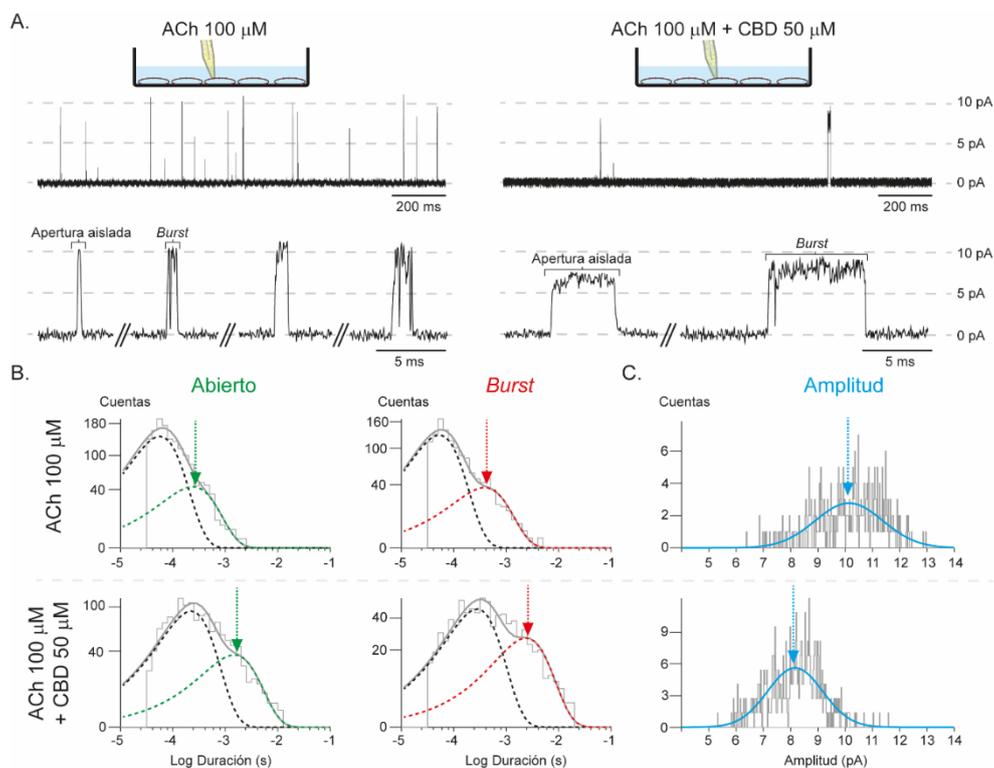


FIGURA III.5. Los canales de $\alpha 7$ disminuyen su y aumentan su duración por acción del CBD.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de CBD 50 μM en la solución de la pipeta, obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*. Para cada condición, los trazos de los canales se muestran en dos escalas temporales diferentes. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Histogramas representativos de estado abierto y de *bursts* para cada condición. Las duraciones informadas en el texto corresponden a las duraciones de los componentes más lentos señalados con las flechas.

(C) Histogramas representativos de amplitud para ambas condiciones, contruidos con eventos de duración igual o mayor a 0,2 ms. Las flechas indican el valor de la amplitud dado por el componente de ajuste de la función gaussiana.

Como se comentó anteriormente, en los experimentos en los cuales se agrega CBD durante el transcurso del registro, además de producirse una rápida (2-5 minutos) reducción de la frecuencia de los episodios de activación (Figura III.3), se observa, más tardíamente (> 10 minutos), la aparición de los eventos de mayor duración y menor amplitud, sobre todo para las concentraciones altas del fitocannabinoide. Por ello, para poner de manifiesto el cambio en la cinética de $\alpha 7$ en función de la concentración de CBD (0,01 μM -50 μM), se midió la duración de los *bursts* antes (2-5 minutos) y después de 10 minutos del agregado, durante un tiempo suficiente, que osciló entre 20-40 minutos, para contar con suficientes eventos (> 700) para construir los histogramas (Figura III.6A). Se expresó como la relación después/antes y se comparó con la relación obtenida tras el agregado de etanol 0,1 %v/v. Como se muestra en la figura III.6B, el aumento en la relación después/antes en la duración de los *bursts* fue estadísticamente significativo a concentraciones de CBD mayores a 1 μM , y mostró una tendencia a incrementarse al ir aumentando la concentración del CBD. Es importante destacar que el agregado de CBD 50 μM produjo un aumento estadísticamente significativo en la duración de los *bursts* (τ_{burst} antes = $0,44 \pm 0,11$ ms; τ_{burst} después = $2,25 \pm 0,90$ ms; n = 5; N = 4; p = 0,00211) que fue similar al aumento en la duración de los *bursts* obtenido cuando el CBD 50 μM se colocó en la pipeta junto a ACh 100 μM (τ_{burst} = $2,36 \pm 0,54$ ms; n = 12; N = 4; p = 0,843), validando de esta manera el protocolo para estudiar los cambios en la cinética de $\alpha 7$ en función de la concentración de CBD agregada durante el trascurso del registro.

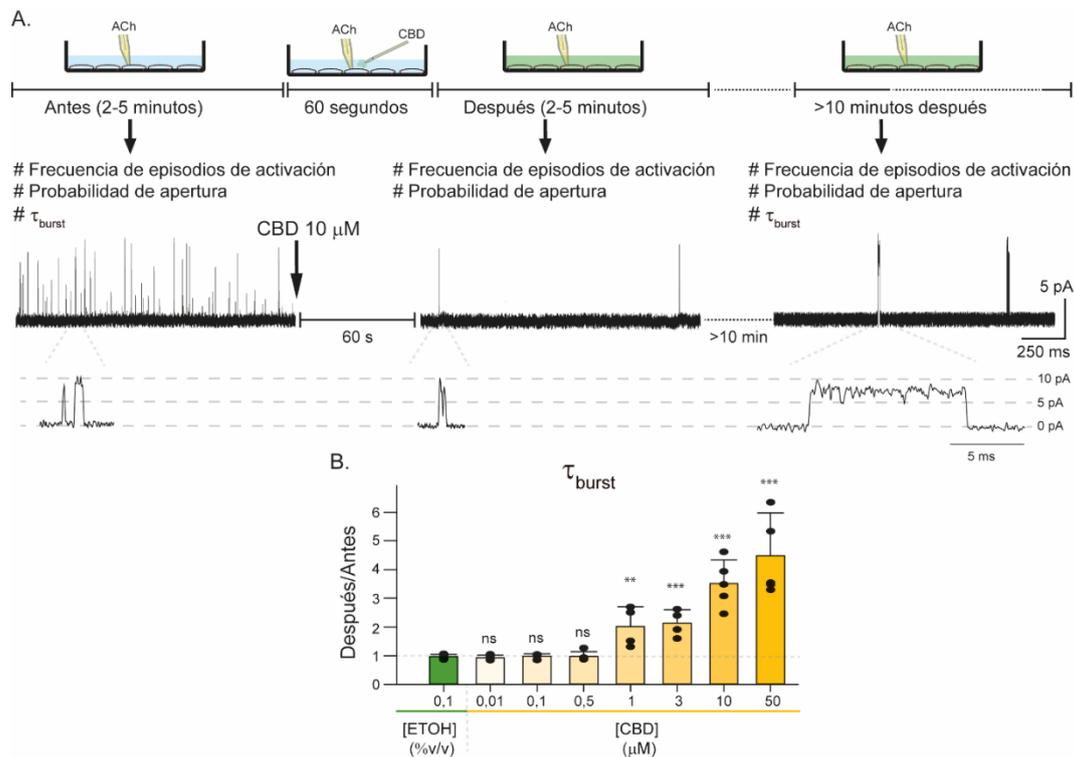


FIGURA III.6. CBD incrementa la duración de los *bursts* de $\alpha 7$ de manera dependiente de la concentración.

(A) Arriba: esquema ilustrativo del diseño experimental. El protocolo es el mismo que el de la figura III.3A, con la incorporación de un nuevo tramo del registro luego de 10 minutos de haber agregado el CBD donde se analiza la duración de los *bursts*. Abajo: registro representativo de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de CBD 10 μM . Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráfico de barras que muestra la relación después/antes en la duración media de los *bursts* debido a la adición de etanol 0,1 %v/v o CBD en diferentes concentraciones. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: etanol 0,1 %v/v ($n = 5$; $N = 3$), CBD 0,01 μM ($n = 5$; $N = 3$), CBD 0,1 μM ($n = 4$; $N = 2$), CBD 0,5 μM ($n = 5$; $N = 2$), CBD 1 μM ($n = 4$; $N = 3$), CBD 3 μM ($n = 4$; $N = 2$), CBD 10 μM ($n = 5$; $N = 3$), y CBD 50 μM ($n = 5$; $N = 3$). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones de etanol (control) y CBD (ns: no significativo, $p \geq 0,05$; el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

Debido a que el parámetro nP_o incluye la frecuencia y duración de los episodios de activación, resulta interesante estudiar de qué manera se ve afectado por la aparición de los eventos largos luego de 10 minutos de agregado el CBD. Para ello se midió la nP_o y la frecuencia de episodios de activación en tres tramos de igual duración de tiempo (2-5 minutos): (i) antes, y (ii) 60 segundos, y (iii) 10 minutos después del agregado de CBD 10 μM ; y se calcularon dos relaciones para cada variable: (i) 60 segundos después/antes, y

(ii) > 10 minutos después/antes (Figura III.6A). Ambas relaciones fueron similares cuando la variable medida fue la frecuencia de los episodios de activación (relación 60 segundos después/antes = $0,11 \pm 0,02$; y relación > 10 minutos después/antes = $0,12 \pm 0,04$; $n = 3$; $N = 3$; $p = 0,864$), pero para el parámetro nP_o , se produjo un aumento estadísticamente significativo en la relación > 10 minutos después/antes en comparación con la relación 60 segundos después/antes ($0,54 \pm 0,21$ y $0,15 \pm 0,04$ respectivamente; $n = 3$; $N = 3$; $p = 0,036$). Esto demuestra que el incremento en la probabilidad de apertura del registro luego de 10 minutos de agregado el CBD con respecto a los 60 segundos posteriores a dicha adición se debe a la aparición de los eventos de mayor duración y no a un cambio en la frecuencia de activación del canal.

Una duda que surge es si estos eventos de mayor duración y menor amplitud son efectivamente canales de $\alpha 7$ modulados por CBD o si son canales que aparecen en respuesta al CBD. Para responder a esta pregunta se realizaron registros de canal único en la configuración *cell-attached* con ACh 100 μM en la pipeta sobre células que no expresaban el receptor $\alpha 7$. En estas condiciones no se detectaron eventos de apertura antes ni después del agregado de CBD 50 μM ($n = 5$; $N = 3$), es decir, no se abren canales en respuesta a ACh, ni a la combinación de ACh y CBD. Por último, con el objetivo de descartar que los canales novedosos sean originados por el etanol usado como vehículo del CBD, se realizaron registros con ACh 100 μM en la pipeta sobre células expresando $\alpha 7$. Se registró la actividad durante 2-5 minutos y se agregó etanol a la cápsula hasta una concentración final de 0,1 %v/v. Luego de 60 segundos se registró la actividad durante otros 2-5 minutos para evidenciar cambios en la frecuencia de los episodios de activación por efecto del etanol. Finalmente, se analizó la duración de los eventos antes y después de 10 minutos de agregado el etanol (tiempo tras el cual aparecen los canales de mayor duración por el agregado de CBD) para poder comparar la cinética. En estas condiciones no se observaron, en ningún momento del registro, los eventos de mayor duración y menor amplitud descritos previamente para CBD ($n = 5$; $N = 3$). El agregado de etanol no produjo cambios en la frecuencia de los episodios de activación (Figura III.3B y 4A) y tampoco modificó la cinética de activación de los canales, es decir, no ocasionó cambios estadísticamente significativos en la duración media de las aperturas aisladas (τ_{open} antes = $0,23 \pm 0,03$ ms; τ_{open} después = $0,24 \pm 0,05$ ms; $n = 5$; $N = 3$; $p = 0,796$) y de los *bursts* (τ_{burst} antes = $0,38 \pm 0,07$ ms; τ_{burst} después = $0,36 \pm 0,09$ ms; $n = 5$; $N = 3$; $p = 0,847$) (Figura III.6B).

1.1.3. ¿Son reversibles los efectos de CBD en la frecuencia y cinética de los episodios de activación de $\alpha 7$?

Considerando los efectos bien marcados del CBD sobre las corrientes unitarias de $\alpha 7$, resulta interesante investigar si estos efectos son reversibles, para lo cual se diseñó un protocolo experimental específico (Figura III.7). Se realizaron registros en la configuración *cell-attached* con ACh 100 μM en la pipeta sobre células expresando $\alpha 7$ en cápsulas conteniendo 1,8 mL de ECS. Luego de 2-5 minutos de registro (antes) se agregó 0,2 mL de CBD 100 μM en ECS para conseguir una concentración final 10 μM en la cápsula, y pasados 60 segundos se registró la actividad del receptor por 2-5 minutos (después) para ver la reducción en la frecuencia de los episodios de activación por efecto del fitocannabinoide. A continuación, se lavó el CBD por medio de tres recambios completos de los 2 mL de ECS de la cápsula, para finalmente volver a registrar la actividad del receptor por 2-5 minutos (lavado). Para cada uno de los 3 períodos detallados (antes, después y lavado) se determinó la frecuencia de los episodios de activación y la nP_o , y se expresó como las relaciones después/antes, y lavado/antes para cada variable.

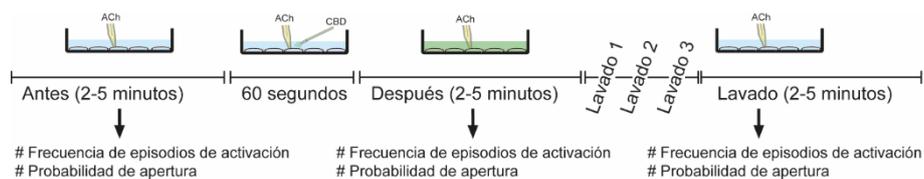


FIGURA III.7. Protocolo experimental de lavado de CBD.

Esquema ilustrativo del diseño experimental aplicado para estudiar la reversibilidad de los efectos que causa CBD sobre el receptor $\alpha 7$ a nivel de canal único. Los 60 segundos luego del agregado de la droga se dejaron para asegurar su correcta difusión y para que se establezca el efecto sobre los canales.

Con este protocolo se demostró que el lavado del CBD no permite recuperar la frecuencia de los episodios de activación previa al cannabinoide, ya que las relaciones después/antes y lavado/antes para esta variable fueron similares ($0,15 \pm 0,06$ y $0,17 \pm 0,05$ respectivamente; $n = 3$; $N = 2$; $p = 0,634$). Es decir, la reducción en la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ como consecuencia de la adición de CBD 10 μM no es reversible por el lavado del CBD en los tiempos y condiciones experimentales aquí utilizados.

Por otro lado, como fue mostrado anteriormente, el agregado del CBD produce una caída inmediata en la nP_o del registro que luego aumenta a tiempos largos de exposición

(> 10 minutos) debido a la aparición de eventos de mayor duración. El lavado aplicado en este nuevo protocolo no impide la aparición de estos novedosos eventos de apertura, lo cual queda evidenciado en el aumento de la nP_o que sucede aun habiendo lavado en comparación con el instante inmediato luego de agregado el fitocannabinoide (relación lavado/antes: $0,54 \pm 0,09$ y relación después/antes: $0,20 \pm 0,09$; $n = 3$; $N = 2$; $p = 0,008$). Nuevamente, podemos concluir que, el efecto de CBD sobre $\alpha 7$, en lo que respecta a la aparición de los eventos de mayor duración, no es reversible por el lavado del fitocannabinoide, al menos en estas condiciones experimentales.

La falta de reversibilidad en los efectos del CBD sobre $\alpha 7$ podría deberse a que el lavado (por tres recambios completos de ECS) no puede eliminar a la droga de la membrana plasmática debido a su gran hidrofobicidad, o también a que la constante de tiempo a la cual se desune del receptor es muy lenta.

Considerados en conjunto, todos estos resultados confirman que el CBD tiene dos efectos sobre las corrientes unitarias de $\alpha 7$. Por un lado, produce una disminución rápida en la frecuencia de los episodios de activación del receptor sin cambios en su cinética. Mientras que, a tiempos más largos de exposición, el fitocannabinoide aumenta la duración y disminuye la amplitud de los episodios de activación. Ambos efectos son dependientes de la concentración del CBD, y ninguno de los dos presenta reversibilidad, al menos en los tiempos de lavado aquí utilizados.

1.2. El CBD disminuye la actividad de $\alpha 7$ activado por ACh y potenciado por distintos PAM

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si el CBD es capaz de inhibir las corrientes microscópicas de $\alpha 7$ activadas por ACh y potenciadas por distintos PAM, a fin de profundizar en el mecanismo que subyace a la disminución de la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ por acción del fitocannabinoide. Para ello se realizaron registros de canal único de $\alpha 7$ mediante la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* colocando en la solución de pipeta ACh $100 \mu\text{M}$ y 5-HI 2 mM (PAM tipo I) o PNU-120596 $1 \mu\text{M}$ (PAM tipo II). Luego de un tiempo de grabación (antes), se agregó CBD a la cápsula y se continuó registrando por el mismo período de tiempo (después). Se midió la frecuencia de los episodios de activación en ambos períodos de tiempo y se expresó como la relación después/antes.

Como se describió en el capítulo I de esta tesis, la actividad de $\alpha 7$ en presencia de ACh 100 μM y 5-HI 2 mM se manifiesta como aperturas aisladas y *bursts* más largos que en ausencia del PAM ($\tau_{\text{open}} = 1,28 \pm 0,35$ ms; $\tau_{\text{burst}} = 3,60 \pm 1,29$ ms; $n = 37$; $N = 11$). El agregado de CBD en estos registros produjo una disminución dependiente de la concentración en la frecuencia de los episodios de activación. El efecto fue estadísticamente significativo a partir de la concentración 100 nM del fitocannabinoide (relación después/antes = $0,67 \pm 0,10$; $n = 5$; $N = 3$; $p = 0,010$) en comparación con el control con etanol 0,1 %v/v (relación después/antes = $0,96 \pm 0,19$; $n = 5$; $N = 3$). Luego de la adición de CBD 1 μM la actividad de $\alpha 7$ fue despreciable (relación después/antes = $0,08 \pm 0,06$; $n = 5$; $N = 3$; $p < 0,001$) (Figura III.8).

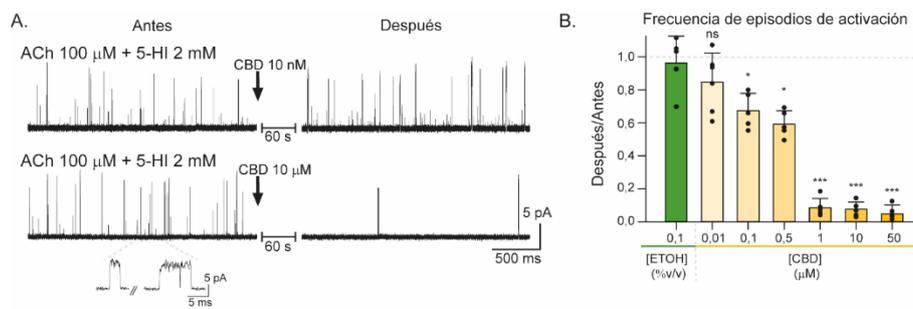


FIGURA III.8. CBD reduce la frecuencia de los canales de $\alpha 7$ activados por ACh y potenciados por 5-HI.

(A) Registros representativos de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM y potenciadas por 5-HI 2 mM obtenidos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de CBD 10 nM (arriba) o 10 μM (abajo). En la parte inferior se muestran con más aumento los típicos eventos de $\alpha 7$ potenciados por 5-HI. Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráfico de barras que muestra la relación después/antes en la frecuencia de los episodios de activación debido a la adición de etanol 0,1 %v/v o CBD en diferentes concentraciones. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: etanol 0,1 %v/v ($n = 5$; $N = 3$), CBD 0,01 μM ($n = 6$; $N = 2$), CBD 0,1 μM ($n = 5$; $N = 3$), CBD 0,5 μM ($n = 5$; $N = 3$), CBD 1 μM ($n = 5$; $N = 3$), CBD 10 μM ($n = 5$; $N = 2$), y CBD 50 μM ($n = 5$; $N = 3$). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones de etanol (control) y CBD (ns: no significativo, $p \geq 0,05$; el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$).

En presencia de PNU-120596, la actividad de $\alpha 7$ activado por ACh se evidencia por aperturas aisladas, *bursts* y *clusters* de gran duración ($\tau_{\text{cluster}} \sim 1-3$ segundos), como se ha descrito en el capítulo II de la tesis (Figura III.9A). En estos registros, el agregado de CBD

50 μM produjo una reducción estadísticamente significativa en la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ (relación después/antes = $0,10 \pm 0,06$; $n = 5$; $N = 3$; $p < 0,001$) comparado con el control donde se adicionó etanol 0,1 %v/v (relación después/antes = $0,96 \pm 0,09$; $n = 5$; $N = 3$; Figura III.9). Para el análisis se consideró que un episodio de activación puede ser una apertura aislada, un *burst* o un *cluster*.

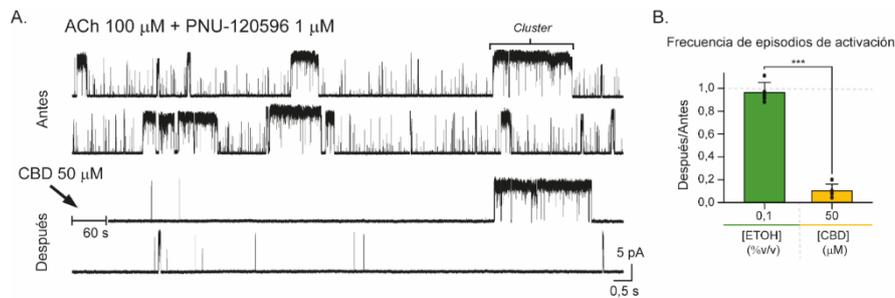


FIGURA III.9. CBD reduce la frecuencia de los canales de $\alpha 7$ activados por ACh y potenciados por PNU-120596.

(A) Registro representativo de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM y potenciadas por PNU-120596 1 μM obtenido por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached*, antes (arriba) y después (abajo) del agregado de CBD 50 μM . Filtro: 3 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráfico de barras que muestra la relación después/antes en la frecuencia de los episodios de activación debido a la adición de etanol 0,1 %v/v o CBD 50 μM . Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: etanol 0,1 %v/v ($n = 5$; $N = 3$) y CBD 50 μM ($n = 5$; $N = 3$). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones de etanol (control) y CBD (el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,001^{***}$).

A partir de estos ensayos, se puede concluir que el CBD es capaz de disminuir la frecuencia de los episodios de activación de $\alpha 7$ potenciados levemente por 5-HI o fuertemente por PNU-120596.

1.3. La actividad de distintos mutantes de $\alpha 7$ se ve inhibida por el CBD

Teniendo en cuenta la modulación negativa que ejerce CBD sobre la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ surge el interés por estudiar en más profundidad cuáles son los mecanismos moleculares que subyacen a este efecto. Para este fin, se utilizaron distintos mutantes del receptor para probar si eran sensibles o no al fitocannabinoide. Cada mutante particular fue expresado de forma heteróloga en células BOSC23, para luego registrar su actividad a nivel de canal único por la técnica de *patch-clamp* en la

configuración *cell-attached* con ACh 100 μ M en la solución de pipeta. Se cuantificó la frecuencia de los episodios de activación antes y después del agregado de CBD 3 μ M y se expresó como la relación después/antes para cada tipo de receptor. Como control, la reducción en la frecuencia de los episodios de activación del receptor salvaje, a esa concentración del cannabinoide, fue del 82 ± 6 % (relación después/antes = $0,18 \pm 0,06$; $n = 6$; $N = 2$) (Figura III.4A).

Con el objetivo de estudiar si CBD modula a $\alpha 7$ al afectar su estado de fosforilación, el primer mutante que se ensayó fue el receptor $\alpha 7$ -Y386F/Y442F. Como se detalló en el capítulo I de esta tesis, este mutante no posee Tyr que puedan fosforilarse en el ICD, ya que han sido sustituidas por fenilalaninas. El agregado de CBD 3 μ M a la cápsula produjo una marcada disminución de la actividad del canal, evidenciada por una reducción en la frecuencia de los episodios de activación del 75 ± 13 % (relación después/antes = $0,25 \pm 0,13$; $n = 6$; $N = 3$; Figura III.10).

Por otro lado, también se quiso investigar si la fosforilación de residuos Ser y Thr del ICD se asocia con el efecto del CBD sobre $\alpha 7$. Para ello, se utilizaron dos mutantes ya descritos en el capítulo I de la tesis, $\alpha 7$ -S365A y $\alpha 7$ -T331A, que carecen de la Ser y la Thr del ICD que poseen mayores probabilidades de fosforilación tienen según el programa NetPhos 3.1. El agregado de CBD 3 μ M durante el curso de los registros produjo una notoria reducción en la frecuencia de los episodios de activación de ambos mutantes: 69 ± 11 % para $\alpha 7$ -S365A (relación después/antes = $0,31 \pm 0,11$; $n = 5$; $N = 3$), y 73 ± 17 % para $\alpha 7$ -T331A (relación después/antes = $0,27 \pm 0,17$; $n = 6$; $N = 3$; Figura III.10).

Por último, estudios previos han demostrado que la mutación simultánea de cinco residuos en la región transmembrana de $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -TSLMF: S223T y A226S en M1, M254L en M2, y I281M y V288F en M3) inhibe la potenciación del receptor por varios PAM, entre ellos PNU-120596, indicando que estos aminoácidos son determinantes de la modulación alostérica del receptor (C. J. P. daCosta et al., 2011; Young et al., 2008a). Para investigar la posibilidad de que estos aminoácidos también sean importantes para la modulación negativa del CBD, se realizaron registros de canal único del receptor $\alpha 7$ -TSLMF activado con ACh 100 μ M. La caracterización cinética de este mutante evidenció un aumento estadísticamente significativo en la duración de las aperturas aisladas ($\tau_{open} = 1,36 \pm 0,50$ ms, $n = 5$, $N = 3$, $p < 0,001$) y de los *bursts* ($\tau_{burst} = 2,31 \pm 0,98$ ms, $n = 5$, $N = 3$, $p < 0,001$) en comparación al receptor salvaje. Por su parte, la adición de CBD 3 μ M en el transcurso

de estos registros produjo una reducción en la frecuencia de los episodios de activación del $68 \pm 15 \%$ (relación después/antes = $0,32 \pm 0,15$; $n = 7$; $N = 3$; Figura III.10).

Habiendo probado que los cuatro mutantes ensayados son sensibles al fitocannabinoide, se quiso ver si la sensibilidad era similar a la del receptor salvaje. La comparación mediante el test de ANOVA mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en el grado de reducción de la frecuencia de los episodios de activación por efecto del CBD entre los 5 receptores ($p = 0,335$; Figura III.10B)

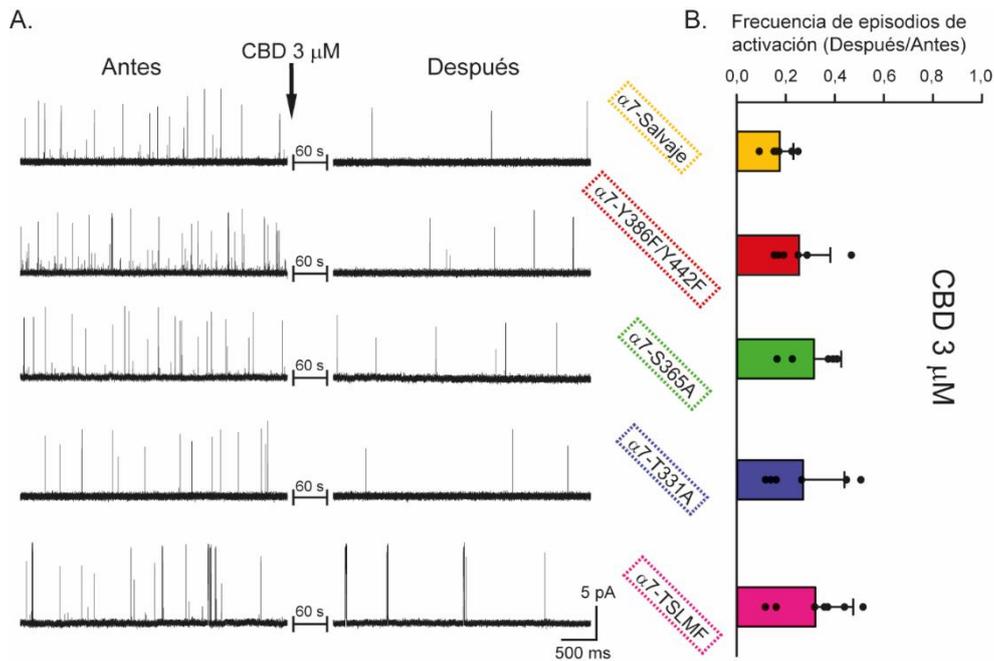


FIGURA III.10. El CBD inhibe la frecuencia de los canales de diferentes mutantes de $\alpha 7$.

(A) Registros representativos de corrientes microscópicas de diferentes mutantes de $\alpha 7$ activadas por ACh $100 \mu\text{M}$ obtenidas por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de CBD $3 \mu\text{M}$. Filtro: 9 kHz . Potencial de membrana: -70 mV . Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráfico de barras que muestra la relación después/antes en la frecuencia de los episodios de activación debido a la adición de CBD $3 \mu\text{M}$ en los diferentes mutantes de $\alpha 7$. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: $\alpha 7$ salvaje ($n = 6$; $N = 2$), $\alpha 7$ -Y386F/Y442F ($n = 6$; $N = 3$), $\alpha 7$ -S365A ($n = 5$; $N = 3$), $\alpha 7$ -T331A ($n = 6$; $N = 3$), y $\alpha 7$ -TSLMF ($n = 7$; $N = 3$). Las comparaciones estadísticas entre los diferentes receptores fueron hechas con ANOVA de una vía. Los valores medios entre los grupos no son estadísticamente significativos ($p = 0,335$).

Estos experimentos con distintos mutantes de $\alpha 7$ permiten concluir que la fosforilación de Tyr del ICD no está involucrada en el efecto del CBD, como así tampoco lo

están las fosforilaciones de la Ser-365 y de la Thr-331. Además, los cinco residuos en la región transmembrana de $\alpha 7$ que afectan la potenciación por ciertos PAM, no son determinantes en el mecanismo de inhibición del receptor por CBD.

1.4. Las corrientes unitarias de $\alpha 7$ son inhibidas desde su cara intracelular por el CBD

La técnica de *patch-clamp* en la configuración *inside-out* permite registrar corrientes unitarias de canales en el parche de membrana aislado de la célula. En esta configuración se pierde gran parte de los contactos de las proteínas insertas en esa porción de membrana con el citoesqueleto y con otras proteínas intracelulares, pero permite evaluar el efecto de compuestos actuando sobre la cara citoplasmática de la membrana. El agonista se coloca en la pipeta de forma similar a lo que se hace en la configuración *cell-attached*.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción del CBD, se realizaron experimentos por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *inside-out* sobre células BOSC23 expresando de forma heteróloga el receptor $\alpha 7$ con ACh 100 μM en la pipeta. Se registró la actividad del canal en estas condiciones y luego se agregó al baño de la cápsula CBD 50 μM para que tome contacto con el lado intracelular de los receptores. Se continuó registrando por un período similar de tiempo, y se analizó y comparó la frecuencia de los episodios de activación antes y después del agregado, expresándose como la relación después/antes. La adición de CBD 50 μM a la cara intracelular de los canales ocasionó una rápida y marcada reducción en la frecuencia de las aperturas (relación después/antes = $0,07 \pm 0,05$; $n = 6$; $N = 2$). Este valor fue similar al obtenido en la configuración *cell-attached* (relación después/antes = $0,07 \pm 0,03$; $n = 5$; $N = 3$; $p = 0,662$; Figura III.11). Además, en esta configuración de *inside-out*, luego de un tiempo (> 10 minutos) del agregado de CBD, también se observaron los episodios de activación de mayor duración y menor amplitud que se describieron previamente en este capítulo en la configuración *cell-attached*.



FIGURA III.11. Efecto de CBD sobre $\alpha 7$ desde el lado intracelular de la membrana.

(A) Registro representativo de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM obtenido por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *inside-out* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de CBD 50 μM . Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráfico de barras que muestra la relación después/antes en la frecuencia de los episodios de activación debido a la adición de CBD 50 μM en registros obtenidos en las configuraciones *cell-attached* e *inside-out*. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: *cell-attached* (n = 5; N = 3) e *inside-out* (n = 6; N = 2). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre ambas condiciones (ns: no significativo, $p \geq 0,05$).

Estos resultados y observaciones permiten concluir que el efecto del CBD sobre las corrientes microscópicas del receptor $\alpha 7$ se produce de manera similar desde ambos lados de la membrana plasmática.

2. Efecto del THC en la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ a nivel de canal único

Existe un reporte previo indicando que el THC, principal componente psicoactivo de la marihuana, no produce efectos sobre las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ expresado en ovocitos de *X. laevis* (Mahgoub et al., 2013). En esta segunda parte del capítulo se estudia si el THC es capaz de modular la actividad de $\alpha 7$ a nivel de canal único, es decir, si modifica la frecuencia y/o duración de los episodios de activación del receptor.

Para tal fin se decidió utilizar el protocolo en el que la droga se adiciona a la cápsula en el transcurso de un registro porque, como hemos demostrado para CBD, permite detectar cambios inmediatos en la frecuencia de las aperturas y también modificaciones en la cinética de los canales luego de algunos minutos de exposición. La actividad de $\alpha 7$ a nivel de canal único fue registrada en la configuración *cell-attached* sobre células BOSC23 expresando el receptor humano con ACh 100 μM en la pipeta. Luego de 2-5 minutos (antes), se agregó el THC a la cápsula hasta una concentración final 10 μM , y se continuó registrando la actividad por el mismo período de tiempo que antes del agregado de la droga (después). Se cuantificó la frecuencia de los episodios de activación antes y después del THC y se expresó como la relación después/antes. Además, se registró la actividad de $\alpha 7$ luego de 10 minutos de agregado el fitocannabinoide para determinar la duración de

las aperturas aisladas y de los *bursts* tras unos minutos de exposición (en este período aparecían los canales largos luego de la adición de CBD).

A diferencia de los resultados obtenidos con CBD, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de los episodios de activación tras el agregado del THC 10 μM comparado contra el control donde se agregó etanol 0,1 %v/v (relación después/antes = $0,97 \pm 0,15$; n = 6; N = 2 y relación después/antes = $0,93 \pm 0,10$; n = 5; N = 3 respectivamente; p = 0,601; Figura III.12A y B). Además, tampoco se observaron los eventos de mayor duración y menor amplitud luego de 10 minutos de exposición al THC. Esto se refleja en la ausencia de cambios estadísticamente significativos en las propiedades cinéticas de los canales (τ_{open} y τ_{burst}) entre el período previo al agregado de la droga y el período luego de 10 minutos de exposición (τ_{open} antes = $0,25 \pm 0,08$ ms; τ_{open} después = $0,24 \pm 0,07$ ms; n = 6; N = 2; p = 0,826; τ_{burst} antes = $0,40 \pm 0,18$ ms; τ_{burst} después = $0,42 \pm 0,20$ ms; n = 6; N = 2; p = 0,937). La relación después/antes de THC, en lo que respecta a la duración de los *bursts*, es igual a la obtenida con etanol (relación después/antes = $1,03 \pm 0,10$; n = 6; N = 2 y relación después/antes = $0,97 \pm 0,08$; n = 5; N = 3 respectivamente; p = 0,335; Figura III.12C).

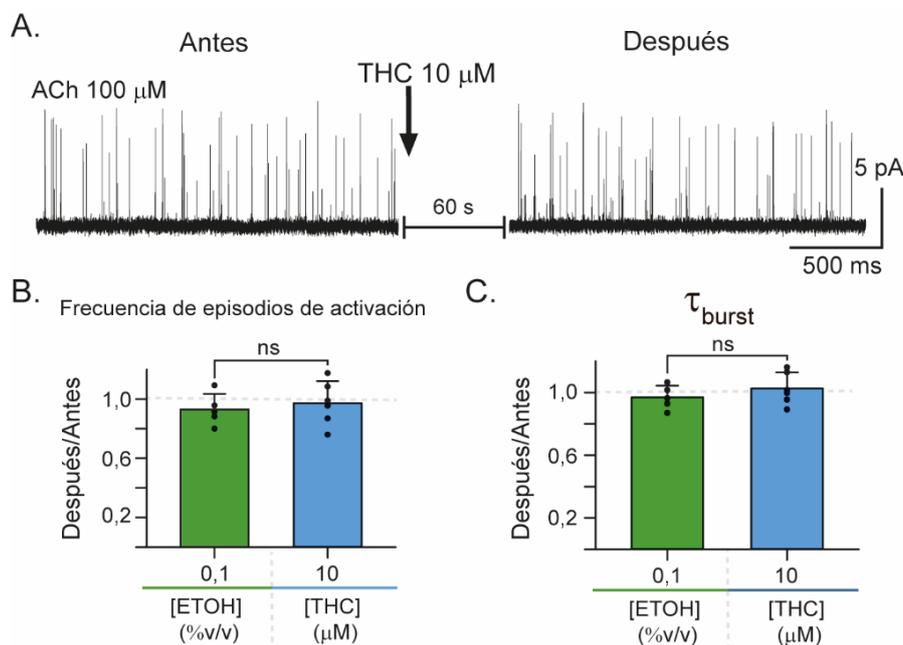


FIGURA III.12. THC no tiene efecto sobre la actividad de $\alpha 7$ a nivel de canal único.

(A) Registro representativo de corrientes unitarias de $\alpha 7$ activadas por ACh 100 μM obtenidas por la técnica de *patch-clamp* en la configuración *cell-attached* antes (izquierda) y después (derecha) del agregado de THC 10 μM . Filtro: 9 kHz. Potencial de membrana: -70 mV. Las aperturas del canal se muestran como deflexiones hacia arriba de la línea de base.

(B) Gráfico de barras que muestra la relación después/antes en la frecuencia de los episodios de activación debido a la adición de etanol 0,1 %v/v o THC 10 μ M. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: etanol (n = 5; N = 3) y THC (n = 6; N = 2). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones de etanol (control) y THC (ns: no significativo, $p \geq 0,05$).

(C) Gráfico de barras que muestra la relación después/antes en la duración media de los *bursts* debido a la adición de etanol 0,1 %v/v o THC 10 μ M. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones después/antes para: etanol (n = 5; N = 3) y THC (n = 6; N = 2). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones de etanol (control) y THC (ns: no significativo, $p \geq 0,05$).

Por lo tanto, es posible concluir que, a diferencia del CBD, el THC no produce modificaciones en la frecuencia y duración de los episodios de activación de $\alpha 7$ a nivel de canal único.

3. Efecto del CBD en la movilización intracelular de Ca^{2+} producida tras la activación de $\alpha 7$

En esta tercera parte del capítulo se explora si el CBD es capaz de modular el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que tiene lugar tras la activación del receptor $\alpha 7$. Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis, la apertura del poro del canal da como resultado una rápida despolarización e ingreso de Ca^{2+} en la célula, que se convierte en un fenómeno sostenido por la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares (Bouzat et al., 2018; F. A. Dajas-Bailador et al., 2002). Teniendo en cuenta el efecto inhibitorio inmediato del CBD sobre la actividad ionotrópica de $\alpha 7$, demostrado en la primera parte de este capítulo, surge el interés por dilucidar si el fitocannabinoide también es capaz de modular negativamente la respuesta metabotrópica del receptor relacionada con el incremento sostenido del nivel de Ca^{2+} tras su activación.

Para poder responder a este interrogante, se trabajó con células BOSC23 expresando de forma heteróloga el receptor $\alpha 7$. Para medir los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en diferentes condiciones experimentales, las células fueron cargadas con una sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} y analizadas mediante microscopía confocal de fluorescencia tras la activación del receptor. La aplicación de ACh 500 μ M junto a PNU-120596 3 μ M, que permite potenciar la respuesta generada (Zanetti et al., 2016), llevó a un rápido incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se mantuvo durante al menos 3 minutos (Figura III.13). Para cuantificar el cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la activación del receptor, se midió la intensidad de

fluorescencia antes (F_0) y 45 segundos después (F_{45}) de la aplicación de ACh y PNU-120596. Se calculó la relación F_{45}/F_0 y se comparó entre las diferentes condiciones ensayadas: (i) control; (ii) Preincubado 3 minutos con etanol 1 %v/v; (iii) Preincubado 3 minutos con CBD 10 μ M; y (iv) Tratado por 3 horas con α -BTX 1 μ M y preincubado 3 minutos con etanol 1 %v/v.

En el control, el pulso de ACh y PNU-120596 provocó un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ ($F_{45}/F_0 = 5,6 \pm 0,7$; $n = 3$; $N = 1$) que no fue afectado por la preincubación de las células con etanol 1 %v/v, usado como vehículo de CBD ($F_{45}/F_0 = 5,7 \pm 2,3$; $n = 5$; $N = 3$; $p = 0,960$; Figura III.13). En cambio, cuando las células fueron preincubadas con CBD 10 μ M, se produjo una reducción estadísticamente significativa en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al pulso de ACh y PNU-120596 ($F_{45}/F_0 = 2,0 \pm 0,7$; $n = 9$; $N = 4$; $p = 0,003$; Figura III.13).

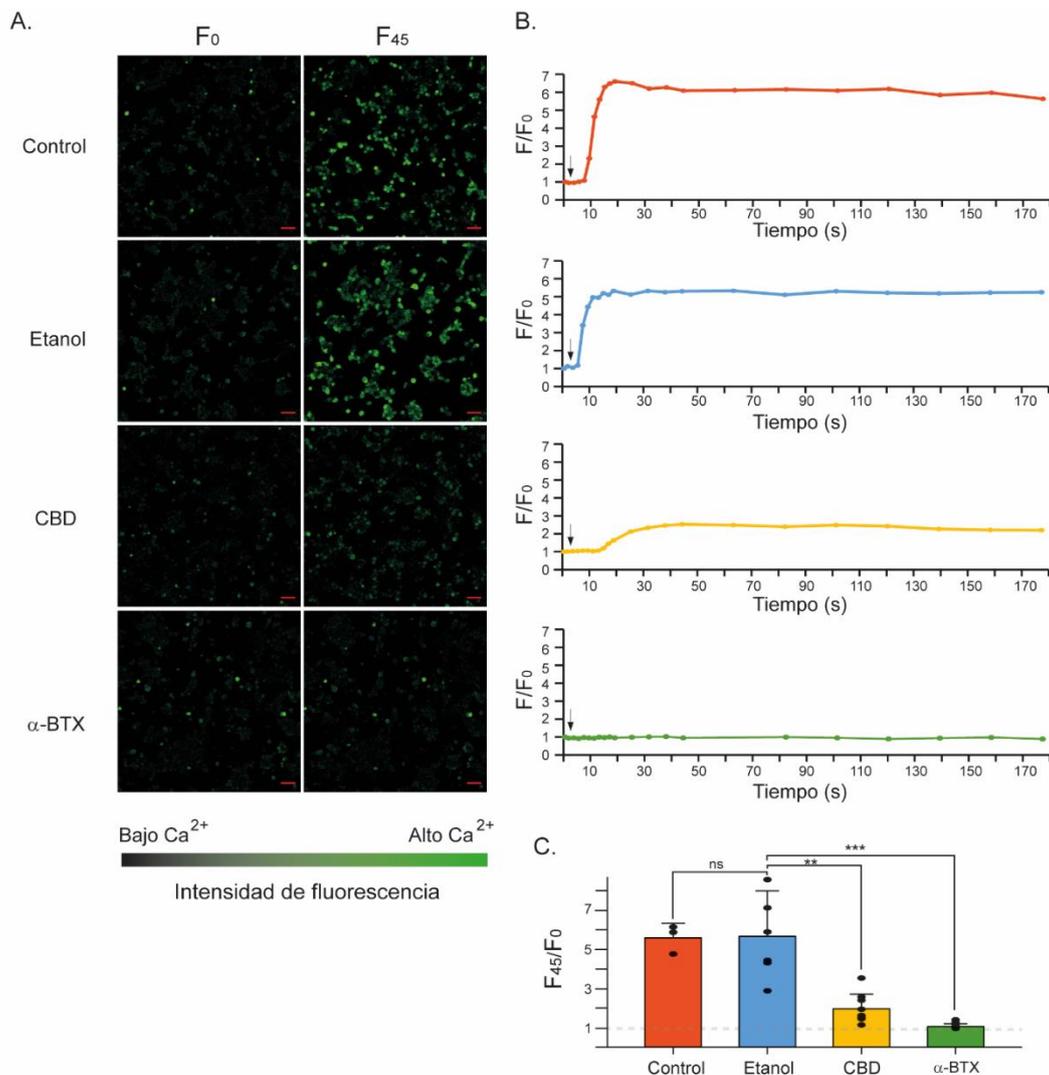


FIGURA III.13. Efecto de CBD en la movilización intracelular de Ca^{2+} disparada tras la activación de $\alpha 7$.

(A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células que expresan $\alpha 7$ cargadas con Fluo-3/AM, antes (F_0) y 45 segundos después (F_{45}) del estímulo con ACh 500 μM y PNU-120596 3 μM . Las diferentes condiciones corresponden a diferentes tratamientos antes del estímulo: (i) Control; (ii) Etanol: preincubación de 3 minutos con etanol al 1 %v/v; (iii) CBD: preincubación de 3 minutos con CBD 10 μM ; y (iv) α -BTX: preincubación de 3 horas con α -BTX 1 μM y preincubación de 3 minutos con etanol al 1 %v/v. La escala roja de las fotos corresponde a 50 μm . La escala de colores representa la intensidad de fluorescencia relativa (F), donde el negro representa los niveles más bajos de Ca^{2+} y el verde los más altos.

(B) Curvas típicas que muestran los cambios en los valores relativos de fluorescencia (F/F_0) en función del tiempo para una célula individual en cada condición detallada en (A). La flecha indica el tiempo de aplicación del estímulo de ACh y PNU-120596.

(C) Gráfico de barras que muestra la relación F_{45}/F_0 para las 4 condiciones ensayadas. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de las relaciones F_{45}/F_0 para: control (n = 3; N = 1), etanol (n = 5; N = 3), CBD (n = 9; N = 4), y α -BTX (n = 8; N = 4). La significancia estadística fue evaluada por el test t-Student a dos colas entre las condiciones: (i) control y etanol, y (ii) etanol y CBD o α -BTX (ns: no significativo, $p \geq 0,05$; el símbolo de asterisco (*) indica significancia estadística: $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$).

Para confirmar que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tiene su origen en la activación y potenciación de $\alpha 7$, se trataron las células durante 3 horas con α -BTX 1 μM (antagonista irreversible de $\alpha 7$). En estas condiciones, comparado contra el control, no hubo cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular tras el estímulo con ACh y PNU-120596 ($F_{45}/F_0 = 1,0 \pm 0,1$; n = 8; N = 4; $p < 0,001$; Figura III.13).

En conjunto estos resultados demuestran que CBD tiene un efecto inhibitorio en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que ocurre tras la activación de $\alpha 7$.

DISCUSIÓN

En los últimos años el CBD está emergiendo fuertemente como un agente terapéutico para diversas condiciones patológicas debido en parte a la ausencia de efectos psicoactivos, pero principalmente a la existencia de un gran cuerpo de evidencia que demuestra sus beneficios terapéuticos. El CBD posee baja afinidad por los CBR, y actúa de forma pleiotrópica sobre una gran variedad de receptores, canales iónicos y vías de señalización (de Almeida y Devi, 2020).

En este tercer capítulo de la tesis se reveló cómo el CBD afecta las funciones ionotrópicas y metabotrópicas del nAChR $\alpha 7$. En lo que respecta a las funciones ionotrópicas, se demostró que el CBD produce una profunda disminución de la actividad del canal a nivel de corrientes microscópicas (Figura III.14). Este efecto es dependiente de la concentración y se da con una CI_{50} en el rango submicromolar ($CI_{50} \sim 0,5 \mu M$), lo que indica una potente modulación negativa de importancia farmacológica. Sin embargo, la modulación de $\alpha 7$ por el CBD a nivel de corrientes unitarias es compleja. Luego de la rápida inhibición del receptor, evidenciada por la disminución en la frecuencia de los episodios de activación, se produce la aparición, al cabo de algunos minutos, de aperturas infrecuentes de mayor duración y menor amplitud. Por otra parte, a nivel celular, el CBD modula negativamente la función metabotrópica de $\alpha 7$ al producir una marcada disminución en las respuestas de Ca^{2+} intracelular que se dan tras la activación del receptor (Figura III.14).

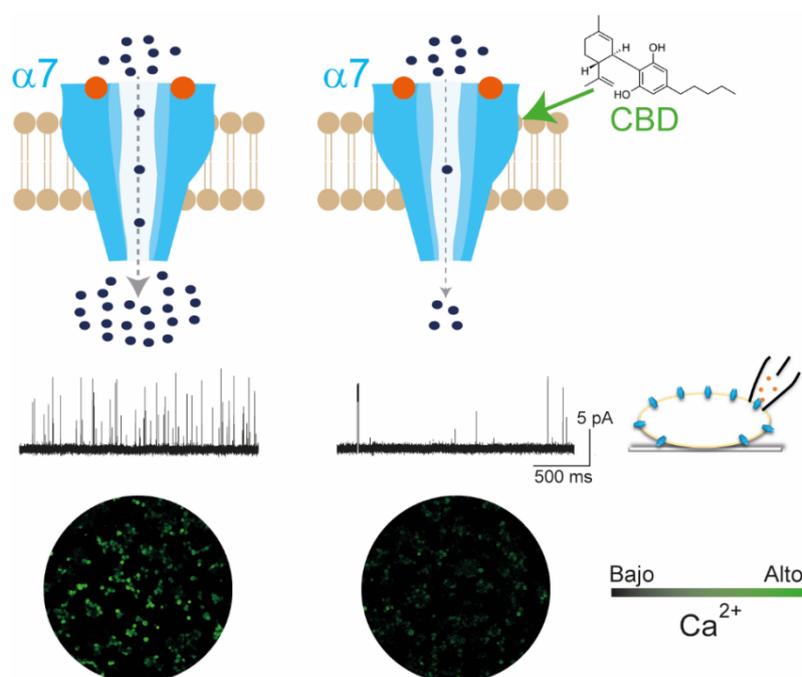


FIGURA III.14. CBD modula negativamente al nAChR $\alpha 7$.

Resumen gráfico de los efectos del CBD sobre las funciones ionotrópicas y metabotrópicas del receptor $\alpha 7$ estudiadas en este capítulo de tesis.

Algunos estudios han demostrado que los endocannabinoides AEA y 2-AG, y la R-metanandamida (análogo metabólicamente estable de la AEA) inhiben alostéricamente a nivel de corrientes macroscópicas las respuestas de $\alpha 7$ expresado en ovocitos de *X. laevis* de una manera independiente de los CBR (Oz et al., 2003, 2004). Estos mismos estudios mostraron que el fitocannabinoide THC y los cannabinoides sintéticos CP 55,940 y WIN55,212-2 no tienen efecto sobre las respuestas de $\alpha 7$. Hasta la fecha existe un solo trabajo que estudió el efecto del CBD sobre este receptor nicotínico (Mahgoub et al., 2013). En este artículo los autores demostraron que el CBD inhibe las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ expresado en ovocitos de *X. laevis* y que también disminuye las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ activadas por colina en interneuronas de hipocampo de rata. Sin embargo, este tipo de registros no brinda información sobre el mecanismo preciso que subyace a la inhibición del receptor. Una reducción de la corriente a nivel macroscópico puede deberse a una disminución de la duración, amplitud o frecuencia de los episodios de activación individuales del canal o a una reducción del número de canales insertos en la membrana, así como también a una combinación de algunos o todos los mecanismos anteriores.

En este último capítulo de la tesis se utilizó la técnica de *patch-clamp* en las configuraciones *cell-attached* e *inside-out* para obtener registros de canal único de alta resolución que permitió demostrar con gran precisión que el efecto modulador negativo del CBD sobre $\alpha 7$ se debe principalmente a una reducción rápida y marcada en la frecuencia de los episodios de activación de una manera dependiente de la concentración. La CI_{50} estimada para la inhibición de la actividad del canal ($\sim 0,5 \mu M$) es significativamente menor que la reportada previamente a partir de la reducción de las corrientes macroscópicas ($\sim 11 \mu M$) (Mahgoub et al., 2013), probablemente debido en parte a la alta resolución temporal de las mediciones de las corrientes unitarias aquí utilizada (Bouzat y Sine, 2018). Por otra parte, al examinar la cinética y amplitud de los eventos modulados por el fitocannabinoide, se observó un efecto llamativo a partir de algunos minutos de exposición, que consistió en la aparición de aperturas, aisladas o en *bursts*, de mayor duración y menor amplitud comparadas con las aperturas del mismo

registro previo al agregado del CBD. El efecto en la duración de los episodios de activación también mostró dependencia de la concentración del CBD, siendo estadísticamente significativo a partir de 1 μM .

Para relacionar los resultados obtenidos en el presente capítulo con la disminución de las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ por el CBD reportada en la bibliografía (Mahgoub et al., 2013) hay que tener en cuenta algunos aspectos del diseño experimental. Por un lado, en los experimentos aquí detallados analizamos dos períodos de tiempo luego del agregado de la droga: (i) uno que va desde 60 segundos hasta 5 minutos como máximo; y (ii) el otro que se inicia luego de 10 minutos y dura entre 20-40 minutos. En el primer período de tiempo, los 60 segundos son necesarios para que difunda el fitocannabinoide y se establezca el efecto sobre la frecuencia de los episodios de activación, que empieza a verse casi instantáneamente. La grabación no se extiende más allá de los 5 minutos para no incluir los eventos de mayor duración y menor amplitud que aparecen esporádicamente luego de unos minutos de exposición. En este primer período de tiempo, los parámetros que se pudieron medir fueron la frecuencia de los episodios de activación y la nP_o . La cinética y amplitud de los canales no pudo cuantificarse debido a la imposibilidad de construir los histogramas con los pocos eventos que se observan en el registro luego del CBD, sobre todo a concentraciones altas. En el segundo período de tiempo, se eligió 10 minutos como punto de inicio para el análisis de los canales porque ya se observan los eventos de mayor duración y menor amplitud. Comenzada en el minuto 10 tras la adición de CBD, la grabación se extendió el tiempo suficiente (entre 20-40 minutos) para contar con suficientes eventos a fin de construir los histogramas de estado abierto y de *bursts*. Por ello, en este segundo período de tiempo, además de la nP_o y la frecuencia de los episodios de activación, también pudo medirse la duración de las aperturas aisladas y de los *bursts*.

Del análisis en el primer período de tiempo se demostró una rápida y clara reducción en la frecuencia de los eventos dependiente de la concentración del CBD. Si bien en este período no se pudo medir la duración de los canales, visualmente no se observaron cambios con respecto a aquellos presentes antes de la adición del CBD. Esto concuerda con el hecho de que, en este período, la reducción en la nP_o , que incluye a la vez la frecuencia y duración de los eventos, tiene una CI_{50} muy similar ($0,47 \pm 0,16 \mu\text{M}$) a la de la reducción en la frecuencia ($0,54 \pm 0,13 \mu\text{M}$). Este resultado no puede correlacionarse con el reportado sobre las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ (Mahgoub et al., 2013) debido

a que en ese trabajo se hace una preincubación de 10-15 minutos con el CBD antes de coaplicarlo con el agonista. Curiosamente, los autores no encuentran efecto del CBD en las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ cuando lo aplican con el agonista sin incubación previa, lo que no concuerda con lo reportado en esta tesis, probablemente debido a un problema resultante de los sistemas lentos de perfusión de ovocitos.

Desde un punto de vista experimental, los resultados de los registros mostrando el efecto del CBD durante el segundo período de tiempo analizado (> 10 minutos) podrían compararse con los resultados en corrientes macroscópicas luego de 10-15 minutos de preincubación con el CBD (Mahgoub et al., 2013). A estos tiempos, se ha demostrado en el presente capítulo que, si bien la frecuencia de los episodios de activación sigue reducida en un grado similar a la del primer período luego de agregada la droga, la duración de los eventos se ve incrementada, explicando la recuperación parcial en la nP_o .

En definitiva, como conclusión se puede decir que el CBD ejerce una inhibición en la actividad ionotrópica de $\alpha 7$ a nivel de corrientes unitarias, lo que está de acuerdo con lo reportado en corrientes macroscópicas (Mahgoub et al., 2013). Esta inhibición es muy marcada ni bien se agrega el fitocannabinoide debido a la rápida reducción en la frecuencia de los episodios de activación, pero es un poco más leve a tiempos de exposición mayores debido a que los canales, reducidos en su frecuencia de aparición, son de mayor duración.

Considerando entonces que la disminución en la frecuencia de los episodios de activación es el principal efecto que ejerce el CBD sobre $\alpha 7$, el siguiente paso es preguntarse cuáles son los posibles mecanismos que la explican. Una actividad reducida puede deberse a una apertura deficiente del canal, al bloqueo del canal o la estabilización de un estado desensibilizado del receptor por acción del CBD. Se puede descartar de esta lista al bloqueo de canal abierto ya que éste se evidencia como una disminución del tiempo de estado abierto dependiente de la concentración (Neher y Steinbach, 1978), hecho no observado en los resultados presentados. Por otra parte, se ha sugerido que el aumento en la velocidad de desensibilización es el mecanismo que explicaría la disminución de las corrientes macroscópicas de los 5-HT₃AR por el CBD (K. H. Yang et al., 2010). En $\alpha 7$, luego de la apertura del canal, el cierre se da por desensibilización (Abierto → Desensibilizado) y no por retorno al estado cerrado (Abierto → Cerrado), es decir, la velocidad de desensibilización es la que gobierna el tiempo de estado abierto del receptor (Bouzat et al., 2008). Por ello, un incremento en la tasa de desensibilización daría como resultado

una disminución en la duración de las aperturas a nivel de corrientes unitarias. Este hecho no fue observado en los experimentos de $\alpha 7$ con CBD y, por lo tanto, se puede desestimar esta explicación propuesta para 5-HT_{3A}R (K. H. Yang et al., 2010). Además, los experimentos con PNU-120596 están en línea con esta última desestimación. Como potente PAM tipo II, PNU-120596 disminuye la velocidad de desensibilización y recupera los receptores desde los estados desensibilizados (R. S. Hurst et al., 2005; Nielsen et al., 2019; Young et al., 2008b). En los experimentos detallados en este capítulo se ha demostrado que la presencia de este PAM no impide la inhibición del CBD (Figura III.9), lo que indica que el fitocannabinoide no afecta la velocidad de desensibilización de $\alpha 7$ o que estabiliza un estado desensibilizado que no puede recuperarse con PNU-120596 (D. K. Williams et al., 2011). Por todo lo anteriormente explicado se puede decir que es muy probable que el CBD inhiba la actividad de $\alpha 7$ al impedir la apertura del canal a través de la estabilización del estado cerrado en reposo o al estabilizar al receptor en un estado desensibilizado estable, no sensible a PNU-120596 (Figura III.15).

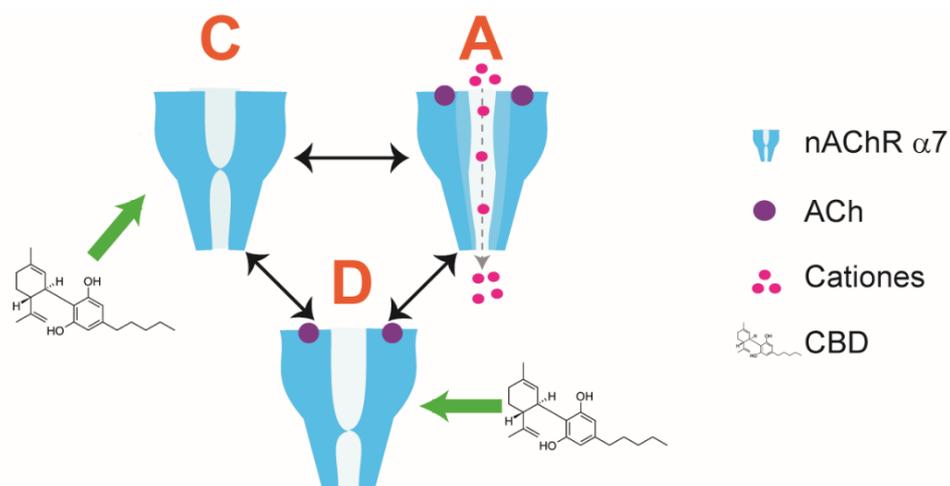


FIGURA III.15. Mecanismo de modulación de $\alpha 7$ por CBD.

El esquema muestra las principales clases de estados conformacionales del receptor $\alpha 7$: Cerrado (C), Abierto (A) y Desensibilizado (D). Las flechas verdes indican los estados conformacionales que podrían ser estabilizados por el CBD.

La aparición de episodios de activación (aislados y en *bursts*) de mayor duración y menor amplitud luego del tratamiento con CBD es un hecho que llamó la atención como un proceso modulador novedoso. Por los controles detallados en la sección de resultados quedó demostrado que para que aparezcan estos eventos es necesario tanto la presencia de ACh como de CBD actuando sobre $\alpha 7$. En línea con el mecanismo de modulación propuesto (Figura III.15), se puede sugerir que dichos episodios son canales del receptor

$\alpha 7$ unido al CBD, que se abren desde el estado conformacional estabilizado por el fitocannabinoide (reposeo o desensibilizado). Otra alternativa es que CBD actúe en dos sitios diferentes sobre el receptor, en uno mediando la disminución en la actividad del canal, y en el otro provocando los cambios en la cinética del mismo.

El CBD y el THC tienen una estructura química muy similar, con la diferencia del cierre de un anillo en el THC en oposición a un grupo hidroxilo libre en el CBD (Figura III.1). A diferencia de lo observado con el CBD, los resultados de los experimentos con el THC demuestran que este fitocannabinoide no tiene efecto sobre $\alpha 7$ a nivel de corrientes microscópicas, ya que no disminuye la frecuencia ni modifica la duración de los episodios de activación del receptor. Este resultado concuerda con lo reportado en la bibliografía a nivel de corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ expresado en ovocitos de *X. laevis* (Oz et al., 2004). Sin embargo, el THC sí tiene efecto sobre la actividad de otros pLGIC, incluidos los GlyR, los 5-HT_{3A}R y los GABA_AR (Bakas et al., 2017; Sigel et al., 2011; Xiong, Cheng, et al., 2011; Xiong et al., 2012; Xiong, Koo, et al., 2011). Se necesitan a futuro estudios estructurales de $\alpha 7$ asociado a diferentes cannabinoides para incrementar el conocimiento de las bases moleculares que expliquen la selectividad del receptor por ciertos cannabinoides.

Con el objetivo de determinar posibles determinantes de $\alpha 7$ en la acción inhibitoria de CBD, se realizaron experimentos con el fitocannabinoide sobre diferentes mutantes del receptor. Esta estrategia se basa en la asunción de que, si un aminoácido de $\alpha 7$ es parte del sitio de unión del CBD o es fundamental para el cambio conformacional del receptor inducido por el CBD para ejercer su efecto inhibitorio, entonces al ser mutado a otro aminoácido con una cadena lateral totalmente distinta, se debería observar la desaparición del efecto del CBD, o por lo menos un cambio significativo en el grado de ese efecto. En otras palabras, se demostró que el principal efecto de CBD sobre la actividad de $\alpha 7$ salvaje a nivel de canal único es la reducción de la frecuencia de los episodios de activación, por lo que, si uno o varios aminoácidos específicos del receptor son importantes para ver este efecto, al ser mutados deberíamos obtener un receptor insensible o menos sensible.

Como se ha detallado en el primer capítulo de la tesis, favorecer el estado fosforilado en las Tyr del ICD de $\alpha 7$ lleva a una disminución en la actividad del receptor a nivel de canal único, a un aumento de la velocidad de desensibilización y a una disminución de la tasa de recuperación desde el estado desensibilizado. Teniendo en cuenta que el CBD

también provoca una inhibición de la actividad de $\alpha 7$, se pensó que el fitocannabinoide podría estar ejerciendo ese efecto al promover la fosforilación de las Tyr, lo que podría ocurrir indirectamente al afectar vías de señalización intracelular que modifiquen actividades de quinasas y fosfatasas (Fouda y Ruben, 2021; Sreevalsan et al., 2011). Para probar esta hipótesis se utilizó el mutante que carece de residuos Tyr en el ICD ($\alpha 7$ -Y386F/Y442F). Este receptor, al igual que el salvaje, muestra una marcada disminución en la actividad del canal luego del agregado del CBD, descartando de esta manera la hipótesis de que el incremento en la fosforilación de las Tyr del ICD es la causa de la inhibición de $\alpha 7$ por el fitocannabinoide.

Por otro lado, también se evaluó si la fosforilación de residuos Ser y Thr del ICD de $\alpha 7$ está involucrada en la acción del CBD. Se utilizaron dos mutantes simples que carecen de la Ser ($\alpha 7$ -S365A) y la Thr ($\alpha 7$ -T331A) con mayor probabilidad de ser fosforilados según la predicción del programa NetPhos 3.1. Uno de los residuos mutados, Ser-365, ya fue reportado en la bibliografía como sitio de fosforilación de la PKA (Komal et al., 2015). La activación de dicha quinasa lleva a la fosforilación de la Ser-365, causando una disminución en las corrientes macroscópicas de $\alpha 7$ (Komal et al., 2015). Similar a lo que se hipotetizó para las Tyr del ICD, el efecto del CBD sobre $\alpha 7$ podría deberse indirectamente a una activación de quinasas, como por ejemplo PKA, que al fosforilar al receptor en algún sitio potencialmente fosforilable de la cara citoplasmática (Ser-365 o Thr-331) lleven a una disminución de su actividad. Como se comentó anteriormente en la sección resultados, el agregado de CBD durante el transcurso de los registros de ambos mutantes produce una disminución de la frecuencia de los episodios de activación similar a la del receptor salvaje. Por lo tanto, las fosforilaciones potenciales de la Ser-365 y de la Thr-331 no están implicadas en el efecto inhibitorio del CBD sobre $\alpha 7$.

El último receptor ensayado fue el quintuple mutante $\alpha 7$ -TSLMF, que posee mutaciones en cinco residuos ubicados en M1, M2 y M3, confiriéndole resistencia a la potenciación por PNU-120596 y otros PAM (C. J. P. daCosta et al., 2011; Nielsen et al., 2019). Estudios estructurales recientes demostraron que no todos estos aminoácidos forman parte del sitio de unión de PNU-120596 (Zhao et al., 2021), aunque si son clave para que sucedan los cambios conformacionales desencadenados tras la unión del PAM al sitio alostérico necesarios para la potenciación del receptor. Los resultados aquí expuestos muestran que, al igual que para el receptor salvaje, el CBD inhibe la actividad del mutante $\alpha 7$ -TSLMF medida a través de la frecuencia de los episodios de activación a

nivel de canal único. Por lo tanto, se puede concluir que estos cinco residuos mutados en $\alpha 7$ -TSLMF no serían importantes en el mecanismo por el cual el CBD inhibe al receptor salvaje. Además, en línea con esta afirmación, el CBD también es capaz de inhibir los canales de $\alpha 7$ potenciados tanto por PNU-120596 (PAM de tipo II), como por 5-HI (PAM de tipo I), indicando que no compite con sus acciones.

En resumen, los cuatro mutantes de $\alpha 7$ aquí ensayados muestran igual sensibilidad al CBD que el receptor salvaje. Es decir, ninguna de las Tyr, ni la Ser-365, ni la Thr-331 del ICD son fundamentales para el mecanismo por el cual CBD inhibe a $\alpha 7$. Tampoco lo son los cinco residuos en el TMD del receptor que le confieren resistencia a distintos PAM.

Los resultados obtenidos de los experimentos en la configuración *inside-out* demuestran que el CBD alcanza su(s) sitio(s) de unión a través de la membrana, de la misma forma que sucede para la unión del CBD en los canales de sodio dependientes de voltaje (Ghovanloo y Ruben, 2022; Sait et al., 2020). Diversos estudios estructurales, de mutagénesis y computacionales han demostrado que una variedad de ligandos alostéricos hidrofóbicos se une en diferentes sitios transmembrana de $\alpha 7$ y de otros pLGIC (Lynagh y Lynch, 2012; Sauguet et al., 2013; Young et al., 2008b). La estructura de $\alpha 7$ formando un complejo con PNU-120596 reveló que el PAM se une a una cavidad transmembrana formada por hélices transmembrana de subunidades adyacentes (Zhao et al., 2021). Por lo tanto, el CBD podría modificar la actividad $\alpha 7$ al unirse a uno o más sitios transmembrana, que aún quedan por definir.

Por otro lado, se ha demostrado que el CBD modula los canales de sodio activados por voltaje por un mecanismo directo, que involucra un bloqueo del poro, pero también por uno indirecto que se relaciona con cambios en la elasticidad de la membrana. Por simulaciones de dinámica molecular y resonancia magnética nuclear se demostró que este fitocannabinoide se localiza en la membrana debajo de los grupos fosfato de los fosfolípidos alterando las propiedades de la bicapa (Ghovanloo et al., 2021). Por lo tanto, similar a lo que sucede en estos canales de sodio, podría sugerirse que los cambios en las propiedades biofísicas de la membrana también pueden alterar las propiedades de activación del receptor $\alpha 7$, lo que da como resultado un mecanismo complementario de modulación del CBD. Si bien es muy hipotético a esta altura, podría suponerse que el efecto inmediato del CBD (reducción de la frecuencia de los episodios de activación) se debe a una interacción directa con el receptor, y que, por el contrario, la aparición más tardía de los eventos de mayor duración y menor amplitud es una consecuencia de

alteraciones en la elasticidad de la membrana. Se requieren estructuras de alta resolución de $\alpha 7$ nAChR en complejo con CBD para identificar con precisión su(s) sitio(s) de unión que, a su vez, podría proporcionar más información sobre sus mecanismos moleculares de acción, así como para dilucidar la base estructural de la selectividad de los cannabinoides.

El receptor $\alpha 7$ tiene un rol dual ionotrópico-metabotrópico. La respuesta ionotrópica que se da tras la activación del receptor se desencadena por la apertura del poro del canal permeable a cationes, lo que da como resultado una rápida despolarización de la membrana y un influjo transitorio de Ca^{2+} en la célula. Esta respuesta ionotrópica rápida se convierte en un fenómeno sostenido y de amplio alcance por la liberación de Ca^{2+} desde reservas intracelulares (Bouzat et al., 2018; F. A. Dajas-Bailador et al., 2002; Guerra-Álvarez et al., 2015; Kabbani y Nichols, 2018). Este aumento de Ca^{2+} intracelular está asociado con neuroprotección e inflamación (Bouzat et al., 2018; Millet et al., 2017; Mizrachi et al., 2021). El mecanismo preciso que vincula las actividades ionotrópicas con las metabotrópicas, incluida la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, aún no está claro y puede diferir entre los diferentes tipos de células (Kabbani y Nichols, 2018). En el modelo celular de expresión de $\alpha 7$ utilizado en este capítulo se detectó un claro aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular tras la activación y potenciación del receptor con ACh y con PNU-120596 respectivamente. Además, se demostró que esta respuesta está mediada por $\alpha 7$ ya que es completamente inhibida por el tratamiento previo de las células con α -BTX, antagonista competitivo que se une a $\alpha 7$ de manera relativamente irreversible. De esta forma, se validó el modelo para el estudio de la actividad metabotrópica del receptor relacionada con el aumento sostenido de Ca^{2+} intracelular tras su activación. Los resultados detallados en este capítulo permitieron demostrar que el CBD es capaz de disminuir el aumento de Ca^{2+} generado por la activación de $\alpha 7$, es decir, el fitocannabinoide no solo modula negativamente las respuestas ionotrópicas del receptor sino también las metabotrópicas, al menos las que se relacionan con el incremento sostenido en los niveles de Ca^{2+} intracelular.

Como se comentó anteriormente en la introducción de este capítulo, la modulación de varios receptores de la familia de los pLGIC por CBD tiene relevancia farmacológica. En el caso del nAChR $\alpha 7$, se sabe que su potenciación es necesaria para mejorar la cognición y la memoria, y que tiene efectos neuroprotectores, antinociceptivos y antiinflamatorios (Bouzat et al., 2018; Millet et al., 2017; Mizrachi et al., 2021). Por lo tanto, el CBD, con el

rol inhibitorio demostrado a lo largo de este capítulo, puede interferir en tratamientos cuyo objetivo sea la potenciación del receptor. Por otro lado, se sabe que $\alpha 7$ media la transducción de señales oncogénicas durante el desarrollo del cáncer, promueve la proliferación de células cancerosas y la metástasis en tejidos pulmonar, gastrointestinal y de la vejiga (Pucci et al., 2021; C. H. Wu et al., 2011). Por ello, la inhibición de $\alpha 7$ se ha propuesto como una posible estrategia terapéutica para varios tipos de cáncer asociados con la sobreexpresión del receptor (Pepper et al., 2017; C. H. Wu et al., 2011). Para estas situaciones patológicas, el efecto inhibitorio de CBD sobre las funciones inotrópicas y metabotrópicas de $\alpha 7$, podría ser beneficioso.

El rango de concentración en el que el CBD modula al nAChR $\alpha 7$ es similar al que tiene lugar en otros canales, transportadores y receptores, incluidos los pLGIC (Ahrens et al., 2009; Bakas et al., 2017; Isaev et al., 2022; Watkins, 2019; K. H. Yang et al., 2010). Las dosis del fitocannabinoide comúnmente utilizadas en modelos animales muestran niveles plasmáticos medios en el rango micromolar bajo (Isaev et al., 2022; Lodzki et al., 2003; Varvel et al., 2006), aunque, como todo compuesto lipofílico, se espera que su concentración en membrana sea más alta que los niveles en sangre. Por lo tanto, la modulación funcional de $\alpha 7$ por parte del CBD puede ser de relevancia farmacológica y debe considerarse en la evaluación de posibles usos terapéuticos. Si bien es importante reconocer los efectos beneficiosos del CBD, es aún más relevante comprender que no es un fármaco milagroso que pueda usarse de manera efectiva en cualquier patología o condición determinada. Debe considerarse que, debido a la gran diversidad de blancos farmacológicos que tiene el CBD, su interacción con alguno de ellos puede contribuir con los efectos beneficiosos, pero con otros puede ocasionar efectos adversos y/o contrarrestar los efectos deseados de fármacos terapéuticos que se estén utilizando en diferentes condiciones patológicas (Isaev et al., 2022). La industria de productos con CBD muestra un gran crecimiento en los últimos años debido al aumento en el interés de posicionar al fitocannabinoide como fármaco para un amplio repertorio de condiciones médicas. Por ello, la información molecular relacionada con las múltiples acciones y blancos del CBD adquiere gran importancia al proporcionar la base para comprender sus aplicaciones en salud humana.

BIBLIOGRAFÍA

- Absalom, N. L., Schofield, P. R., y Lewis, T. M. (2009). Pore structure of the Cys-loop ligand-gated ion channels. *Neurochemical research*, 34(10), 1805-1815. <https://doi.org/10.1007/S11064-009-9971-2>
- Abu-Sawwa, R., Scutt, B., y Park, Y. (2020). Emerging Use of Epidiolex (Cannabidiol) in Epilepsy. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG*, 25(6), 485-499. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-25.6.485>
- Acharya, S., y Kim, K. M. (2019). $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor downregulates D3 dopamine receptor expression through protein kinase C activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 514(3), 665-671. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.05.020>
- Acuña, M. A., Yévenes, G. E., Ralvenius, W. T., Benke, D., Di Lio, A., Lara, C. O., Muñoz, B., Burgos, C. F., Moraga-Cid, G., Corringier, P. J., y Zeilhofer, H. U. (2016). Phosphorylation state-dependent modulation of spinal glycine receptors alleviates inflammatory pain. *Journal of Clinical Investigation*, 126(7), 2547-2560. <https://doi.org/10.1172/JCI83817>
- Agnati, L. F., Guidolin, D., Guescini, M., Genedani, S., y Fuxe, K. (2010). Understanding wiring and volume transmission. *Brain research reviews*, 64(1), 137-159. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2010.03.003>
- Ahmad, S., She, Z., y Kraatz, H. B. (2019). Electrochemical studies of human nAChR $\alpha 7$ subunit phosphorylation by kinases PKA, PKC and Src. *Analytical Biochemistry*, 574, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.012>
- Ahrens, J., Demir, R., Leuwer, M., De La Roche, J., Krampfl, K., Foadi, N., Karst, M., y Haeseler, G. (2009). The nonpsychotropic cannabinoid cannabidiol modulates and directly activates $\alpha 1$ and $\alpha 1$ - β glycine receptor function. *Pharmacology*, 83(4), 217-222. <https://doi.org/10.1159/000201556>
- Albuquerque, E. X., Deshpande, S. S., Aracava, Y., Alkondon, M., y Daly, J. W. (1986). A possible involvement of cyclic AMP in the expression of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS letters*, 199(1).
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., y Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 89(1), 73-120. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00015.2008>
- Althoff, T., Hibbs, R. E., Banerjee, S., y Gouaux, E. (2014). X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature*, 512(7514), 333-337. <https://doi.org/10.1038/NATURE13669>
- Andersen, K. G., Rambaut, A., Ian Lipkin, W., Holmes, E. C., y Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 26, 450-452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>

- Andersen, N., Corradi, J., Sine, S. M., y Bouzat, C. (2013a). Stoichiometry for activation of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(51), 20819-20824. https://doi.org/10.1073/PNAS.1315775110/SUPPL_FILE/PNAS.201315775SI.PDF
- Andersen, N., Nielsen, B. E., Corradi, J., Tolosa, M. F., Feuerbach, D., Arias, H. R., y Bouzat, C. (2016). Exploring the positive allosteric modulation of human $\alpha 7$ nicotinic receptors from a single-channel perspective. *Neuropharmacology*, *107*, 189-200. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.02.032>
- Aran, A., Harel, M., Cassuto, H., Polyansky, L., Schnapp, A., Wattad, N., Shmueli, D., Golan, D., y Castellanos, F. X. (2021). Cannabinoid treatment for autism: a proof-of-concept randomized trial. *Molecular autism*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S13229-021-00420-2>
- Arzimanoglou, A., Brandl, U., Cross, J. H., Gil-Nagel, A., Lagae, L., Landmark, C. J., Specchio, N., Nabbout, R., Thiele, E. A., y Gubbay, O. (2020). Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*, *22*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1684/EPD.2020.1141>
- Aschner, Y., y Downey, G. P. (2018). The importance of tyrosine phosphorylation control of cellular signaling pathways in respiratory disease: pY and pY not. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *59*(5), 535-547. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0049TR>
- Báez-Pagán, C. A., Delgado-Vélez, M., y Lasalde-Dominicci, J. A. (2015). Activation of the Macrophage $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, *10*(3), 468-476. <https://doi.org/10.1007/S11481-015-9601-5>
- Bakas, T., van Nieuwenhuijzen, P. S., Devenish, S. O., McGregor, I. S., Arnold, J. C., y Chebib, M. (2017). The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonoyl glycerol at GABAA receptors. *Pharmacological research*, *119*, 358-370. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2017.02.022>
- Barann, M., Molderings, G., Brüß, M., Bönisch, H., Urban, B. W., y Göthert, M. (2002). Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *British journal of pharmacology*, *137*(5), 589-596. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0704829>
- Baranowska, U., Göthert, M., Rudz, R., y Malinowska, B. (2008). Methanandamide allosterically inhibits in vivo the function of peripheral nicotinic acetylcholine receptors containing the alpha 7-subunit. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *326*(3), 912-919. <https://doi.org/10.1124/JPET.108.140863>
- Baur, R., Kielar, M., Richter, L., Ernst, M., Ecker, G. F., y Sigel, E. (2013). Molecular analysis of the site for 2-arachidonoylglycerol (2-AG) on the β_2 subunit of GABA(A) receptors. *Journal of neurochemistry*, *126*(1), 29-36. <https://doi.org/10.1111/JNC.12270>

- Benallegue, N., Mazzaferro, S., Alcaino, C., y Bermudez, I. (2013). The additional ACh binding site at the $\alpha 4(+)/\alpha 4(-)$ interface of the $(\alpha 4\beta 2)2\alpha 4$ nicotinic ACh receptor contributes to desensitization. *British journal of pharmacology*, 170(2), 304-316. <https://doi.org/10.1111/BPH.12268>
- Bertrand, D., y Gopalakrishnan, M. (2007). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 74(8), 1155-1163. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2007.07.011>
- Biaggi-Labiosa, N. M., Avilés-Pagán, E., Caballero-Rivera, D., Báez-Pagán, C. A., y Lasalde-Dominicci, J. A. (2015). Engineering $\alpha 4\beta 2$ nAChRs with reduced or increased nicotine sensitivity via selective disruption of consensus sites in the M3-M4 cytoplasmic loop of the $\alpha 4$ subunit. *Neuropharmacology*, 99, 273-284. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.022>
- Blunt, C. E. W., y Dougherty, D. A. (2019). Binding interactions of NS6740, a silent agonist of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular Pharmacology*, 96(2), 212-218. <https://doi.org/10.1124/mol.119.116244>
- Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J. P., Delarue, M., y Corringer, P. J. (2008). X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 2008 457:7225, 457(7225), 111-114. <https://doi.org/10.1038/nature07462>
- Bodnar, A. L., Cortes-Burgos, L. A., Cook, K. K., Dinh, D. M., Groppi, V. E., Hajos, M., Higdon, N. R., Hoffmann, W. E., Hurst, R. S., Myers, J. K., Rogers, B. N., Wall, T. M., Wolfe, M. L., y Wong, E. (2005). Discovery and structure-activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 48(4), 905-908. <https://doi.org/10.1021/JM049363Q>
- Bondarenko, V., Wells, M. M., Chen, Q., Tillman, T. S., Singewald, K., Lawless, M. J., Caporoso, J., Brandon, N., Coleman, J. A., Saxena, S., Lindahl, E., Xu, Y., y Tang, P. (2022). Structures of highly flexible intracellular domain of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Nature communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-28400-X>
- Borges, L. S., y Ferns, M. (2001). Agrin-induced Phosphorylation of the Acetylcholine Receptor Regulates Cytoskeletal Anchoring and Clustering. *The Journal of Cell Biology*, 153(1). <http://www.jcb.org/cgi/content/full/153/1/1>
- Borges, L. S., Yechikhov, S., Lee, Y. I., Rudell, J. B., Friese, M. B., Burden, S. J., y Ferns, M. J. (2008). Identification of a motif in the acetylcholine receptor β subunit whose phosphorylation regulates rapsyn association and postsynaptic receptor localization. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11468-11476. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2508-08.2008>
- Bouzat, C. (2012). New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *Journal of physiology, Paris*, 106(1-2), 23-33. <https://doi.org/10.1016/J.JPHYSPARIS.2011.09.012>

- Bouzat, C., y Barrantes, F. J. (1996). Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoid hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade. *Journal of Biological Chemistry*, 271(42), 25835-25841. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.42.25835>
- Bouzat, C., Bartos, M., Corradi, J., y Sine, S. M. (2008). The interface between extracellular and transmembrane domains of homomeric Cys-loop receptors governs open-channel lifetime and rate of desensitization. *Journal of Neuroscience*, 28(31), 7808-7819. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0448-08.2008>
- Bouzat, C., Bren, N., y Sine, S. M. (1994). Structural Basis of the Different Gating Kinetics of Fetal and Adult Acetylcholine Receptors. *Neuron*, 13(6), 1395-1402.
- Bouzat, C., Gumilar, F., Spitzmaul, G., Wang, H. L., Rayes, D., Hansen, S. B., Taylor, P., y Sine, S. M. (2004). Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature*, 430(7002), 896-900. <https://doi.org/10.1038/NATURE02753>
- Bouzat, C., Lasala, M., Nielsen, B. E., Corradi, J., Del, M., y Esandi, C. (2018). Molecular function of $\alpha 7$ nicotinic receptors as drug targets. *The Journal of Physiology*, 596(10), 1847-1861. <https://doi.org/10.1113/JP275101>
- Bouzat, C., y Sine, S. M. (2018). Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level. *British Journal of Pharmacology*, 175, 1789. <https://doi.org/10.1111/bph.v175.11/issuetoc/Abbreviations>
- Brams, M., Gay, E. A., Sáez, J. C., Guskov, A., Van Elk, R., Van Der Schors, R. C., Peigneur, S., Tytgat, J., Strelkov, S. V., Smit, A. B., Yakel, J. L., y Ulens, C. (2011). Crystal Structures of a Cysteine-modified Mutant in Loop D of Acetylcholine-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4420-4428. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.188730>
- Brejč, K., Van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., Van Der Oost, J., Smit, A. B., y Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 411(6835), 269-276. <https://doi.org/10.1038/35077011>
- Briggs, C. A., y Gopalakrishnan, M. (2007). Ion Channels – Ligand Gated. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2, 877-918. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00067-5>
- Buckingham, S. D., Jones, A. K., Brown, L. A., y Sattelle, D. B. (2009). Nicotinic Acetylcholine Receptor Signalling: Roles in Alzheimer's Disease and Amyloid Neuroprotection. *Pharmacological Reviews*, 61(1), 39. <https://doi.org/10.1124/PR.108.000562>
- Cafiero, C., Micera, A., Re, A., Postiglione, L., Cacciamani, A., Schiavone, B., Benincasa, G., y Palmirotta, R. (2021). Could Small Neurotoxins-Peptides be Expressed during SARS-CoV-2 Infection? *Current Genomics*, 22(8), 557-563. <https://doi.org/10.2174/1389202923666211221111527>

- Calimet, N., Simoes, M., Changeux, J. P., Karplus, M., Taly, A., y Cecchini, M. (2013). A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), E3987-E3996. https://doi.org/10.1073/PNAS.1313785110/SUPPL_FILE/SAPP.PDF
- Cantuti-Castelvetri, L., Ojha, R., Pedro, L. D., Djannatian, M., Franz, J., Kuivanen, S., van der Meer, F., Kallio, K., Kaya, berk, Anastasina, M., Smura, T., Levanov, L., Szirovicza, L., Tobi, A., Kallio-Kokko, H., Österlund, P., Joensuu, M., Meunier, F. A., Butcher, S. J., ... Simons, M. (2020). Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*, 370(6518), 856-860.
- Casalino, L., Gaieb, Z., Goldsmith, J. A., Hjorth, C. K., Dommer, A. C., Harbison, A. M., Fogarty, C. A., Barros, E. P., Taylor, B. C., Mclellan, J. S., Fadda, E., y Amaro, R. E. (2020). Beyond shielding: The roles of glycans in the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Central Science*, 6(10), 1722-1734. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01056>
- Castelán, F., Mulet, J., Aldea, M., Sala, S., Sala, F., y Criado, M. (2007). Cytoplasmic regions adjacent to the M3 and M4 transmembrane segments influence expression and function of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. A study with single amino acid mutants. *J. Neurochem*, 100, 406-415. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04202.x>
- Castillo-Arellano, J., Canseco-Alba, A., Cutler, S. J., y León, F. (2023). The Polypharmacological Effects of Cannabidiol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(7). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28073271>
- Chang, Q., y Fischbach, G. D. (2006). An acute effect of neuregulin 1β to suppress $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*, 26(44), 11295-11303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1794-06.2006>
- Changeux, J. P., Amoura, Z., Rey, F. A., y Miyara, M. (2020). A nicotinic hypothesis for Covid-19 with preventive and therapeutic implications. En *Comptes Rendus - Biologies* (Vol. 343, Número 1, pp. 33-39). Academie des sciences. <https://doi.org/10.5802/crbiol.8>
- Changeux, J. P., y Christopoulos, A. (2016). Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. *Cell*, 166(5), 1084-1102. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.08.015>
- Charpantier, E., Wiesner, A., Huh, K. H., Ogier, R., Hoda, J. C., Allaman, G., Raggenbass, M., Feuerbach, D., Bertrand, D., y Fuhrer, C. (2005). $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *Journal of Neuroscience*, 25(43), 9836-9849. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3497-05.2005>
- Chatzidaki, A., y Millar, N. S. (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 97(4), 408-417. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2015.07.028>

- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., y Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*, 130(5), 2620-2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
- Cho, C. H., Song, W., Leitzell, K., Teo, E., Meleth, A. D., Quick, M. W., y Lester, R. A. J. (2005). Rapid upregulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine dephosphorylation. *Journal of Neuroscience*, 25(14), 3712-3723. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5389-03.2005>
- Chojnacka, K., Papke, R. L., y Horenstein, N. A. (2013). Synthesis and evaluation of a conditionally-silent agonist for the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(14), 4145-4149. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2013.05.039>
- Chrestia, J. F., Turani, O., Araujo, N. R., Hernando, G., Esandi, M. del C., y Bouzat, C. (2023). Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by post-translational modifications. *Pharmacological research*, 190, 106712. <https://doi.org/10.1016/J.PHR.2023.106712>
- Cieśla, J., Frączyk, T., y Rode, W. (2011). Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochimica Polonica*, 58(2), 137-147. www.actabp.pl
- Clapham, D. E., y Neher, E. (1984). SUBSTANCE P REDUCES ACETYLCHOLINE INDUCED CURRENTS IN ISOLATED BOVINE CHROMAFFIN CELLS. *The Journal of physiology*, 347, 255-277.
- Colledge, M., y Froehner, S. C. (1997). Tyrosine Phosphorylation of Nicotinic Acetylcholine Receptor Mediates Grb2 Binding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(3), 5038-5045.
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., y Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 56(1), 2. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2008.06.063>
- Corradi, J., y Bouzat, C. (2016a). Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: implications for drug discovery. *Molecular Pharmacology*, 90(3), 288-299. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104240>
- Corradi, J., Gumilar, F., y Bouzat, C. (2009). Single-Channel Kinetic Analysis for Activation and Desensitization of Homomeric 5-HT_{3A} Receptors. *Biophysical Journal*, 97(5), 1335. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2009.06.018>
- Corringer, P.-J., Le Novère, N., y Changeux, J.-P. (2000). NICOTINIC RECEPTORS AT THE AMINO ACID LEVEL. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 40, 431-458. www.annualreviews.org

- Cui, J., Li, F., y Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Curran, J., y Mohler, P. J. (2015). Alternative paradigms for ion channelopathies: Disorders of ion channel membrane trafficking and posttranslational modification. *Annual Review of Physiology*, 77, 505-524. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071838>
- daCosta, C. J. B., y Baenziger, J. E. (2009). A lipid-dependent uncoupled conformation of the acetylcholine receptor. *The Journal of biological chemistry*, 284(26), 17819-17825. <https://doi.org/10.1074/JBC.M900030200>
- daCosta, C. J. B., y Baenziger, J. E. (2013). Gating of pentameric ligand-gated ion channels: structural insights and ambiguities. *Structure (London, England : 1993)*, 21(8), 1271-1283. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2013.06.019>
- daCosta, C. J. B., Free, C. R., Corradi, J., Bouzat, C., y Sine, S. M. (2011). Single-Channel and Structural Foundations of Neuronal $\alpha 7$ Acetylcholine Receptor Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 31(39), 13870-13879. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2652-11.2011>
- daCosta, C. J. B., Free, C. R., y Sine, S. M. (2015). Stoichiometry for α -bungarotoxin block of $\alpha 7$ acetylcholine receptors. *Nature communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS9057>
- Dajas-Bailador, F. A., Mogg, A. J., y Wonnacott, S. (2002). Intracellular Ca^{2+} signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} stores. *Journal Neurochemistry*, 81, 606-614. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00846.x>
- Dajas-Bailador, F., y Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in pharmacological sciences*, 25(6), 317-324. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2004.04.006>
- Daly, J. L., Simonetti, B., Klein, K., Chen, K.-E., Kavanagh Williamson, M., Antón-Plágaro, C., Shoemark, D. K., Simón-Gracia, L., Bauer, M., Hollandi, R., Greber, U. F., Horvath, P., Sessions, R. B., Helenius, A., Hiscox, J. A., Teesalu, T., Matthews, D. A., Davidson, A. D., Collins, B. M., ... Yamauchi, Y. (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*, 370(6818), 861-865. <https://www.science.org>
- Dani, J. A., y Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, 699-729. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.47.120505.105214>
- Davis, M. J., Wu, X., Nurkiewicz, T. R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M. A., y Wilson, E. (2001). Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 281(5). <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.2001.281.5.H1835>

- de Almeida, D. L., y Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology research & perspectives*, 8(6).
<https://doi.org/10.1002/PRP2.682>
- De Jonge, W. J., y Ulloa, L. (2007). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *British journal of pharmacology*, 151(7), 915-929. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0707264>
- De Rosa, M. J., Esandi, M. D. C., Garelli, A., Rayes, D., y Bouzat, C. (2005). Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*, 160(1-2), 154-161.
<https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2004.11.010>
- Del Castillo, J., y Katz, B. (1957). A comparison of acetylcholine and stable depolarizing agents. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 146(924), 362-368. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1957.0017>
- Deribe, Y. L., Pawson, T., y Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. En *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 17, Número 6, pp. 666-672). <https://doi.org/10.1038/nsmb.1842>
- Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., Notcutt, W. G., Martinez-Orgado, J., Robson, P. J., Rohrback, B. G., Thiele, E., Whalley, B., y Friedman, D. (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55(6), 791-802. <https://doi.org/10.1111/EPI.12631>
- Di Angelantonio, S., Piccioni, A., Moriconi, C., Trettel, F., Cristalli, G., Grassi, F., y Limatola, C. (2011). Adenosine A2A receptor induces protein kinase A-dependent functional modulation of human $\alpha 3\beta 4$ nicotinic receptor. *Journal of Physiology*, 589(11), 2755-2766. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.207282>
- Dilger, J. P., Boguslavsky, R., Barann, M., Katz, T., y Vidal, A. M. (1997). Mechanisms of Barbiturate Inhibition of Acetylcholine Receptor Channels. *Journal of General Physiology*, 109(3), 401-414. <http://rupress.org/jgp/article-pdf/109/3/401/1189083/gp-7394.pdf>
- Dilger, J. P., y Bretth, R. S. (1991). Actions of Volatile Anesthetics and Alcohols on Cholinergic Receptor Channels". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 625(1), 616-627. www.pdfflib.com
- Dineley, K. T., Pandya, A. A., y Yakel, J. L. (2015). Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(2), 96-108.
<https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2014.12.002>
- Downing, J. E. G., y Role, L. W. (1987). Activators of protein kinase C enhance acetylcholine receptor desensitization in sympathetic ganglion neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7739-7743.

- Drago, J., McColl, C. D., Horne, M. K., Finkelstein, D. I., y Ross, S. A. (2003). Neuronal nicotinic receptors: Insights gained from gene knockout and knockin mutant mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(7), 1267-1280.
<https://doi.org/10.1007/s00018-003-2259-9>
- D'Souza, R. D., y Vijayaraghavan, S. (2014). Paying attention to smell: Cholinergic signaling in the olfactory bulb. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 6(SEP).
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00021>
- Duan, G., y Walther, D. (2015). The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks. *PLoS Computational Biology*, 11(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004049>
- Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., León, R., y Lopez, M. G. (2015). Anti-inflammatory role of microglial $\alpha 7$ nAChRs and its role in neuroprotection. En *Biochemical Pharmacology* (Vol. 97, Número 4, pp. 463-472). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.032>
- Eilers, H., Schaeffer, E., Bickler, P. E., y Forsayeth, J. R. (1997). Functional Deactivation of the Major Neuronal Nicotinic Receptor Caused by Nicotine and a Protein Kinase C-Dependent Mechanism. *Molecular Pharmacology*, 52(6), 1105-1112.
<https://doi.org/10.1124/MOL.52.6.1105>
- Elnagar, M. R., Walls, A. B., Helal, G. K., Hamada, F. M., Thomsen, M. S., y Jensen, A. A. (2018). Functional characterization of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine and NMDA receptor signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells in an ERK phosphorylation assay. *European Journal of Pharmacology*, 826, 106-113.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.02.047>
- Engel, A. G. (2018). Congenital Myasthenic Syndromes in 2018. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18(8). <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0852-4>
- Erwin Neher, B., y Henry Steinbach, J. (1978). Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *The Journal of Physiology*, 277, 153-176. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012267>
- Eusebi, F., Molinaro, M., y Zani, B. M. (1985). Agents That Activate Protein Kinase C Reduce Acetylcholine Sensitivity in Cultured Myotubes. *The Journal of cell biology*, 100(4), 1339-1342.
- Fabian-Fine, R., Skehel, P., Errington, M. L., Davies, H. A., Sher, E., Stewart, M. G., y Fine, A. (2001). Ultrastructural distribution of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(20), 7993-8003.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-07993.2001>
- Fabiani, C., Murray, A. P., Corradi, J., y Antollini, S. S. (2018). A novel pharmacological activity of caffeine in the cholinergic system. *Neuropharmacology*, 135, 464-473.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2018.03.041>

- Fan, P. (1995). Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT₃ receptors in rat nodose ganglion neurons. *Journal of neurophysiology*, 73(2), 907-910.
<https://doi.org/10.1152/JN.1995.73.2.907>
- Farsalinos, K., Eliopoulos, E., Leonidas, D. D., Papadopoulos, G. E., Tzartos, S., y Poulas, K. (2020). Nicotinic cholinergic system and covid-19: In silico identification of an interaction between sars-cov-2 and nicotinic receptors with potential therapeutic targeting implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1-15.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165807>
- Farsalinos, K., Niaura, R., Le Houezec, J., Barbouni, A., Tsatsakis, A., Kouretas, D., Vantarakis, A., y Poulas, K. (2020). Editorial: Nicotine and SARS-CoV-2: COVID-19 may be a disease of the nicotinic cholinergic system. *Toxicology Reports*, 7, 658-663.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.012>
- Fenster, C. P., Beckman, M. L., Parker, J. C., Sheffield, E. B., Whitworth, T. L., Quick, M. W., y Lester, R. A. J. (1999). Regulation of alpha4beta2 Nicotinic Receptor Desensitization by Calcium and Protein Kinase C. *Molecular pharmacology*, 55(3), 432-443.
<http://www.molpharm.org>
- Ferns, M. (2021). An inside job: Molecular determinants for postsynaptic localization of nicotinic acetylcholine receptors. *Molecules*, 26(11).
<https://doi.org/10.3390/molecules26113065>
- Foadi, N., Leuwer, M., Demir, R., Dengler, R., Buchholz, V., De La Roche, J., Karst, M., Haeseler, G., y Ahrens, J. (2010). Lack of positive allosteric modulation of mutated alpha(1)S267I glycine receptors by cannabinoids. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 381(5), 477-482. <https://doi.org/10.1007/S00210-010-0506-9>
- Forrest, A. R. R., Taylor, D. F., Fink, J. L., Gongora, M. M., Flegg, C., Teasdale, R. D., Suzuki, H., Kanamori, M., Kai, C., Hayashizaki, Y., y Grimmond, S. M. (2006). PhosphoregDB: The tissue and sub-cellular distribution of mammalian protein kinases and phosphatases. En *BMC Bioinformatics* (Vol. 7, Número 82).
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-82>
- Fouda, M. A., y Ruben, P. C. (2021). Protein Kinases Mediate Anti-Inflammatory Effects of Cannabidiol and Estradiol Against High Glucose in Cardiac Sodium Channels. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 1004.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.668657/BIBTEX>
- Frazier, C. J., Rollins, Y. D., Breese, C. R., Leonard, S., Freedman, R., y Dunwiddie, T. V. (1998). Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(4), 1187-1195.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-04-01187.1998>
- Friedman, D., y Devinsky, O. (2016). Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy. *The New England Journal of Medicine*, 374(1), 94-95.
<https://doi.org/10.1056/nejmc1512758>

- Friese, M. B., Blagden, C. S., y Burden, S. J. (2007). Synaptic differentiation is defective in mice lacking acetylcholine receptor β -subunit tyrosine phosphorylation. *Development*, 134(23), 4167-4176. <https://doi.org/10.1242/dev.010702>
- Fucile, S. (2017). The Distribution of Charged Amino Acid Residues and the Ca²⁺ Permeability of Nicotinic Acetylcholine Receptors: A Predictive Model. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00155>
- Fuhrer, C., y Hall, Z. W. (1996). Functional Interaction of Src Family Kinases with the Acetylcholine Receptor in C2 Myotubes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 32474-32481. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.50.32474>
- Fuk-Woo Chan, J., Kok, K.-H., Zhu, Z., Chu, H., Kai-Wang To, K., Yuan, S., y Yuen, K.-Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 221-236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1737364>
- Gao, F., Bren, N., Burghardt, T. P., Hansen, S., Henchman, R. H., Taylor, P., McCammon, J. A., y Sine, S. M. (2005). Agonist-mediated conformational changes in acetylcholine-binding protein revealed by simulation and intrinsic tryptophan fluorescence. *The Journal of biological chemistry*, 280(9), 8443-8451. <https://doi.org/10.1074/JBC.M412389200>
- Gao, L., y Greenfield, L. J. (2005). Activation of protein kinase C reduces benzodiazepine potency at GABA A receptors in NT2-N neurons. *Neuropharmacology*, 48(3), 333-342. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.10.010>
- Gay, E. A., Giniatullin, R., Skorinkin, A., y Yakel, J. L. (2008). Aromatic residues at position 55 of rat $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors are critical for maintaining rapid desensitization. *The Journal of Physiology*, 586(4), 1105-1115. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2007.149492>
- George, S., Pal, A. C., Gagnon, J., Timalisina, S., Singh, P., Vydyam, P., Munshi, M., Chiu, J. E., Renard, I., Harden, C. A., Ott, I. M., Watkins, A. E., Vogels, C. B. F., Lu, P., Tokuyama, M., Venkataraman, A., Casanovas-Massana, A., Wyllie, A. L., Rao, V., ... Mamoun, C. Ben. (2021). Evidence for SARS-CoV-2 Spike Protein in the Urine of COVID-19 Patients. *Kidney360*, 2(6), 924-936. <https://doi.org/10.34067/KID.0002172021>
- Gharpure, A., Teng, J., Zhuang, Y., Noviello, C. M., Walsh, R. M., Cabuco, R., Howard, R. J., Zaveri, N. T., Lindahl, E., y Hibbs, R. E. (2019). Agonist Selectivity and Ion Permeation in the $\alpha 3\beta 4$ Ganglionic Nicotinic Receptor. *Neuron*, 104(3), 501-511.e6. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.07.030>
- Ghovanloo, M. R., Choudhury, K., Bandaru, T. S., Fouda, M. A., Rayani, K., Rusinova, R., Phaterpekar, T., Nelkenbrecher, K., Watkins, A. R., Poburko, D., Thewalt, J., Andersen, O. S., Delemotte, L., Goodchild, S. J., y Ruben, P. C. (2021). Cannabidiol inhibits the skeletal muscle nav1.4 by blocking its pore and by altering membrane elasticity. *Journal of General Physiology*, 153(5). <https://doi.org/10.1085/JGP.202012701/211970>

- Ghovanloo, M. R., y Ruben, P. C. (2022). Cannabidiol and Sodium Channel Pharmacology: General Overview, Mechanism, and Clinical Implications. *Neuroscientist*, 28(4), 318-334.
https://doi.org/10.1177/10738584211017009/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_10738584211017009-FIG7.JPEG
- Gielen, M., y Corringer, P. J. (2018). The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *The Journal of physiology*, 596(10), 1873-1902. <https://doi.org/10.1113/JP275100>
- Gielen, M., Thomas, P., y Smart, T. G. (2015). The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), 1-10.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7829>
- Gill, J. K., Savolainen, M., Young, G. T., Zwart, R., Sher, E., y Millar, N. S. (2011). Agonist activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(14), 5867-5872.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.1017975108>
- Gill-Thind, J. K. K., Dhankher, P., D'Oyley, J. M., Sheppard, T. D., y Millar, N. S. (2015). Structurally similar allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors exhibit five distinct pharmacological effects. *The Journal of biological chemistry*, 290(6), 3552-3562. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.619221>
- Golovko, T., Min, R., Lozovaya, N., Falconer, C., Yatsenko, N., Tsintsadze, T., Tsintsadze, V., Ledent, C., Harvey, R. J., Belevi, D., Lambert, J. J., Rozov, A., y Burnashev, N. (2015). Control of Inhibition by the Direct Action of Cannabinoids on GABAA Receptors. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 25(9), 2440-2455.
<https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHU045>
- Gonzalez-Rubio, J., Navarro-Lopez, C., Lopez-Najera, E., Lopez-Najera, A., Jimenez-Diaz, L., Navarro-Lopez, J. D., y Najera, A. (2020). Cytokine Release Syndrome (CRS) and Nicotine in COVID-19 Patients: Trying to Calm the Storm. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01359>
- Gopalakrishnan, M., Molinari, E. J., y Sullivan, J. P. (1997). Regulation of Human alpha4beta2 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors by Cholinergic Channel Ligands and Second Messenger Pathways. *Molecular pharmacology*, 52(3), 524-534.
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., M Poon, L. L., Samborskiy, D. V, Sidorov, I. A., Sola, I., y Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536-544.
<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Gotti, C., y Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, 74(6), 363-396.
<https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2004.09.006>

- Grando, S. A. (2014). Connections of nicotine to cancer. *Nature reviews. Cancer*, 14(6), 419-429. <https://doi.org/10.1038/NRC3725>
- Grant, S. N., y Lester, H. A. (2021). Regulation of epithelial sodium channel activity by SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 proteins. *Biophysical Journal*, 120(14), 2805-2813. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.06.005>
- Green, W. N., Ross, A. F., y Claudio, T. (1991). Acetylcholine Receptor Assembly Is Stimulated by Phosphorylation of Its γ Subunit. *Neuron*, 7, 659-666.
- Grønlien, J. H., Håkerud, M., Ween, H., Thorin-Hagene, K., Briggs, C. A., Gopalakrishnan, M., y Malysz, J. (2007). Distinct profiles of $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Molecular Pharmacology*, 72(3), 715-724. <https://doi.org/10.1124/mol.107.035410>
- Gu, S., Matta, J. A., Lord, B., Harrington, A. W., Sutton, S. W., Davini, W. B., y Bredt, D. S. (2016). Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron*, 89(5), 948-955. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.01.018>
- Guan, Y. Z., Jin, X. D., Guan, L. X., Yan, H. C., Wang, P., Gong, Z., Li, S. J., Cao, X., Xing, Y. L., y Gao, T. M. (2015). Nicotine inhibits microglial proliferation and is neuroprotective in global ischemia rats. *Molecular neurobiology*, 51(3), 1480-1488. <https://doi.org/10.1007/S12035-014-8825-3>
- Gubbins, E. J., Gopalakrishnan, M., y Li, J. (2010). $\alpha 7$ nAChR-mediated activation of MAP kinase pathways in PC12 cells. *Brain Research*, 1328, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.083>
- Guerra-Álvarez, M., Moreno-Ortega, A. J., Navarro, E., Fernández-Morales, J. C., Egea, J., López, M. G., y Cano-Abad, M. F. (2015). Positive allosteric modulation of alpha-7 nicotinic receptors promotes cell death by inducing Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum. *Journal of neurochemistry*, 133(3), 309-319. <https://doi.org/10.1111/JNC.13049>
- Guidolin, D., Tortorella, C., Marcoli, M., Maura, G., y Agnati, L. F. (2022). Intercellular Communication in the Central Nervous System as Deduced by Chemical Neuroanatomy and Quantitative Analysis of Images: Impact on Neuropharmacology. *International journal of molecular sciences*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS23105805>
- Hajiasgharzadeh, K., Sadigh-Eteghad, S., Mansoori, B., Mokhtarzadeh, A., Shanehbandi, D., Doustvandi, M. A., Asadzadeh, Z., y Baradaran, B. (2019). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in lung inflammation and carcinogenesis: Friends or foes? *Journal of cellular physiology*, 234(9), 14666-14679. <https://doi.org/10.1002/JCP.28220>
- Hales, T. G., Dunlop, J. I., Deeb, T. Z., Carland, J. E., Kelley, S. P., Lambert, J. J., y Peters, J. A. (2006). Common determinants of single channel conductance within the large cytoplasmic loop of 5-hydroxytryptamine type 3 and alpha4beta2 nicotinic

- acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry*, 281(12), 8062-8071. <https://doi.org/10.1074/JBC.M513222200>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., y Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 391(2), 85-100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Han, L., Talwar, S., Wang, Q., Shan, Q., y Lynch, J. W. (2013). Phosphorylation of $\alpha 3$ glycine receptors induces a conformational change in the glycine-binding site. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(10), 1361-1370. <https://doi.org/10.1021/cn400097j>
- Hansen, S. B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., y Bourne, Y. (2005). Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO Journal*, 24(20), 3635-3646. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600828>
- Harvey, R. J., Depner, U. B., Wässle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T. G., Harvey, K., Schütz, B., Abo-Salem, O. M., Zimmer, A., Poisbeau, P., Welzl, H., Wolfer, D. P., Betz, H., Hanns, †, Zeilhofer, U., y Müller, U. (2014). GlyR 3: An Essential Target for Spinal PGE 2-Mediated Inflammatory Pain Sensitization. *Science*, 304(5672), 884-887. www.sciencemag.org
- Hejazi, N., Zhou, C., Oz, M., Sun, H., Jiang, H. Y., y Zhang, L. (2006). Delta9-tetrahydrocannabinol and endogenous cannabinoid anandamide directly potentiate the function of glycine receptors. *Molecular pharmacology*, 69(3), 991-997. <https://doi.org/10.1124/MOL.105.019174>
- Hendriks, W. J. A. J., Elson, A., Harroch, S., Pulido, R., Stoker, A., y Den Hertog, J. (2013). Protein tyrosine phosphatases in health and disease. *The FEBS journal*, 280(2), 708-730. <https://doi.org/10.1111/febs.12000>
- Hibbs, R. E., Sulzenbacher, G., Shi, J., Talley, T. T., Conrod, S., Kem, W. R., Taylor, P., Marchot, P., y Bourne, Y. (2009). Structural determinants for interaction of partial agonists with acetylcholine binding protein and neuronal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO Journal*, 28(19), 3040-3051. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.227>
- Hilf, R. J. C., y Dutzler, R. (2008). X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 2008 452:7185, 452(7185), 375-379. <https://doi.org/10.1038/nature06717>
- Hilf, R. J., y Dutzler, R. (2009). A prokaryotic perspective on pentameric ligand-gated ion channel structure. *Current opinion in structural biology*, 19(4), 418-424. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2009.07.006>
- Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J., y Stephens, G. J. (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacology & therapeutics*, 133(1), 79-97. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2011.09.002>

- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., y Pöhlmann, S. (2020). A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular cell*, 78(4), 779-784.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., y Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hone, A. J., y Mcintosh, J. M. (2017). Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain. *FEBS letters*, 592(7), 1045-1062. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12884>
- Hopfield, J. F., Tank, D. W., Greengard, P., y Haganir, R. L. (1988). Functional modulation of nAChR by tyrosine phosphorylation. *Nature*, 336(6200), 677-680.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., y Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Número 3, pp. 141-154). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huang, K. Y., Lee, T. Y., Kao, H. J., Ma, C. T., Lee, C. C., Lin, T. H., Chang, W. C., y Huang, H. Da. (2019). DbPTM in 2019: Exploring disease association and cross-Talk of post-Translational modifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D298-D308. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1074>
- Huang, X., Chen, H., y Shaffer, P. L. (2017). Crystal Structures of Human GlyR α 3 Bound to Ivermectin. *Structure (London, England : 1993)*, 25(6), 945-950.e2. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2017.04.007>
- Hueffer, K., Khatri, S., Rideout, S., Harris, M. B., Papke, R. L., Stokes, C., y Schulte, M. K. (2017). Rabies virus modifies host behaviour through a snake-toxin like region of its glycoprotein that inhibits neurotransmitter receptors in the CNS. *Scientific Reports*, 7(1), 12818. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12726-4>
- Haganir, R. L., Delcour, A. H., Greengard, P., y Hess, G. P. (1986). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature*, 321(6072), 774-776.
- Haganir, R. L., y Greengard, P. (1983). cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the nicotinic acetylcholine receptor (membrane channel/calmodulin/calcium). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(4), 1130-1134.
- Haganir, R. L., Miles, K., y Greengard, P. (1984). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by an endogenous tyrosine-specific protein kinase.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81(22), 6968-6972.

- Hurst, R., Rollema, H., y Bertrand, D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 137(1), 22-54. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2012.08.012>
- Hurst, R. S., Hajós, M., Raggenbass, M., Wall, T. M., Higdon, N. R., Lawson, J. A., Rutherford-Root, K. L., Berkenpas, M. B., Hoffmann, W. E., Piotrowski, D. W., Groppi, V. E., Allaman, G., Ogier, R., Bertrand, S., Bertrand, D., y Arneric, S. P. (2005). A Novel Positive Allosteric Modulator of the 7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor: In Vitro and In Vivo Characterization. *The Journal of Neuroscience*, 25(17), 4396-4405. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5269-04.2005>
- Ibeas Bih, C., Chen, T., Nunn, A. V. W., Bazelot, M., Dallas, M., y Whalley, B. J. (2015). Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 12(4), 699-730. <https://doi.org/10.1007/S13311-015-0377-3>
- Isaev, D., Shabbir, W., Dinc, E. Y., Lorke, D. E., Petroianu, G., y Oz, M. (2022). Cannabidiol Inhibits Multiple Ion Channels in Rabbit Ventricular Cardiomyocytes. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 35. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.821758/BIBTEX>
- Izzo, A. A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V., y Mechoulam, R. (2009). Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in pharmacological sciences*, 30(10), 515-527. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2009.07.006>
- Jin, J., y Pawson, T. (2012). Modular evolution of phosphorylation-based signalling systems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1602), 2540-2555. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0106>
- Jones, I. W., y Wonnacott, S. (2004). Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(50), 11244-11252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3009-04.2004>
- Jones, S., y Yakel, J. L. (2003). Casein kinase II (protein kinase CK2) regulates serotonin 5-HT3 receptor channel function in NG108-15 cells. *Neuroscience*, 119(3), 629-634. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00202-1)
- Kabbani, N., y Nichols, R. A. (2018). Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 39(4), 354-366. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2018.01.002>
- Kabbani, N., Nordman, J. C., Corgiat, B. A., Veltri, D. P., Shehu, A., Seymour, V. A., y Adams, D. J. (2013). Insights & Perspectives Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *Bioessays*, 35, 1025-1034. <https://doi.org/10.1002/bies.201300082>

- Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M., y Tzartos, S. J. (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *The FEBS journal*, 274(15), 3799-3845. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2007.05935.X>
- Kandel E., Koester J., Mack S., y Siegelbaum S. (2021). *PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE*. www.mhprofessional.com.
- Kanno, T., Yaguchi, T., Nagata, T., y Nishizaki, T. (2012). Indomethacin Activates Protein Kinase C and Potentiates $\alpha 7$ ACh Receptor Responses. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 29(1-2), 189-196. www.karger.comwww.karger.com/cpb
- Karlin, A. (1967). On the application of «a plausible model» of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *Journal of theoretical biology*, 16(2), 306-320. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90011-2)
- Karve, T. M., y Cheema, A. K. (2011). Small Changes Huge Impact: The Role of Protein Posttranslational Modifications in Cellular Homeostasis and Disease. *Journal of Amino Acids*, 2011, 1-13. <https://doi.org/10.4061/2011/207691>
- Kasheverov, I., Kudryavtsev, D., Shelukhina, I., Nikolaev, G., Utkin, Y., y Tsetlin, V. (2022). Marine Origin Ligands of Nicotinic Receptors: Low Molecular Compounds, Peptides and Proteins for Fundamental Research and Practical Applications. *Biomolecules*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/BIOM12020189>
- Kawashima, K., y Fujii, T. (2004). Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 9, 2063-2085. <https://doi.org/10.2741/1390>
- Kelley, S. P., Dunlop, J. I., Kirkness, E. F., Lambert, J. J., y Peters, J. A. (2003). A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature*, 424(6946), 321-324. <https://doi.org/10.1038/NATURE01788>
- Kihara, T., Shimohama, S., Sawada, H., Honda, K., Nakamizo, T., Shibasaki, H., Kume, T., y Akaike, A. (2001). $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Transduces Signals to Phosphatidylinositol 3-Kinase to Block A β -Amyloid-induced Neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13541-13546. <https://doi.org/10.1074/JBC.M008035200>
- King, J. R., Nordman, J. C., Bridges, S. P., Lin, M. K., y Kabbani, N. (2015). Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of biological chemistry*, 290(33), 20060-20070. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.647040>
- Komal, P., Estakhr, J., Kamran, M., Renda, A., y Nashmi, R. (2015). cAMP-dependent protein kinase inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity in layer 1 cortical interneurons through activation of D1/D5 dopamine receptors. *Journal of Physiology*, 593(16), 3513-3532. <https://doi.org/10.1113/JP270469>

- Komal, P., Gudavicius, G., Nelson, C. J., y Nashmi, R. (2014). T-cell receptor activation decreases excitability of cortical interneurons by inhibiting $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Journal of Neuroscience*, 34(1), 22-35. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2093-13.2014>
- Kooijman, S., Meurs, I., van der Stoep, M., Habets, K. L., Lammers, B., Berbée, J. F. P., Havekes, L. M., van Eck, M., Romijn, J. A., Korporaal, S. J. A., y Rensen, P. C. N. (2015). Hematopoietic $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor deficiency increases inflammation and platelet activation status, but does not aggravate atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13(1), 126-135. <https://doi.org/10.1111/jth.12765>
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I., McDanal, C., Perez, L. G., Tang, H., ... Wyles, M. D. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, 182(4), 812-827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
- Kouhen, R. E. L., Hu, M., Anderson, D. J., Li, J., y Gopalakrishnan, M. (2009). Pharmacology of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor mediated extracellular signal-regulated kinase signalling in PC12 cells. *British Journal of Pharmacology*, 156(4), 638-648. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00069.x>
- Kracun, S., Harkness, P. C., Gibb, A. J., y Millar, N. S. (2008). Influence of the M3–M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function. *British Journal of Pharmacology*, 153(7), 1474. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0707676>
- Kumar, P., y Meizel, S. (2005). Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), 25928-25935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502435200>
- Kuo, Y. P., Xu, L., Eaton, J. B., Zhao, L., Wu, J., y Lukas, R. J. (2005). Roles for nicotinic acetylcholine receptor subunit large cytoplasmic loop sequences in receptor expression and function. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 314(1), 455-466. <https://doi.org/10.1124/JPET.105.084954>
- Kuryatov, A., Luo, J., Cooper, J., y Lindstrom, J. (2005). Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human $\alpha 4\beta 2$ acetylcholine receptors. *Molecular Pharmacology*, 68(6), 1839-1851. <https://doi.org/10.1124/mol.105.012419>
- Lape, R., Colquhoun, D., y Sivilotti, L. G. (2008). On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature*, 454(7205), 722. <https://doi.org/10.1038/NATURE07139>
- Larsen, H. M., Hansen, S. K., Mikkelsen, J. D., Hyttel, P., y Stummann, T. C. (2019). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors and neural network synaptic transmission in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Stem Cell Research*, 41. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101642>

- Lasala, M., Fabiani, C., Corradi, J., Antollini, S., y Bouzat, C. (2019). Molecular Modulation of Human $\alpha 7$ Nicotinic Receptor by Amyloid- β Peptides. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00037>
- Laverty, D., Thomas, P., Field, M., Andersen, O. J., Gold, M. G., Biggin, P. C., Gielen, M., y Smart, T. G. (2017). Crystal structures of a GABAA-receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites. *Nature structural & molecular biology*, 24(11), 977-985. <https://doi.org/10.1038/NSMB.3477>
- Law, R. J., Henchman, R. H., y McCammon, J. A. (2005). A gating mechanism proposed from a simulation of a human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), 6813-6818. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0407739102>
- Le Novere, N., y Changeux, J. P. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *Journal of molecular evolution*, 40(2), 155-172. <https://doi.org/10.1007/BF00167110>
- Le Novère, N., y Changeux, J.-P. (2001). LGICdb: the ligand-gated ion channel database. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 294-295. <http://www.pasteur.fr/recherche/banques/LGIC/LGIC.html>
- Le Novère, N., Corringer, P. J., y Changeux, J. P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Journal of neurobiology*, 53(4), 447-456. <https://doi.org/10.1002/NEU.10153>
- Lee, A. M., Wu, D. F., Dadgar, J., Wang, D., McMahon, T., y Messing, R. O. (2015). PKC ϵ phosphorylates $\alpha 4\beta 2$ nicotinic ACh receptors and promotes recovery from desensitization. *British Journal of Pharmacology*, 172(17), 4430-4441. <https://doi.org/10.1111/bph.13228>
- Lei, Y., Zhang, J., Schiavon, C. R., He, M., Chen, L., Shen, H., Zhang, Y., Yin, Q., Cho, Y., Andrade, L., Shadel, G. S., Hepokoski, M., Lei, T., Wang, H., Zhang, J., Yuan, J. X. J., Malhotra, A., Manor, U., Wang, S., ... Shyy, J. Y. J. (2021). SARS-CoV-2 Spike Protein Impairs Endothelial Function via Downregulation of ACE 2. En *Circulation Research* (Vol. 128, Número 9, pp. 1323-1326). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.318902>
- Lendvai, B., Kassai, F., Szájli, ágota, y Némethy, Z. (2013). $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Research Bulletin*, 93, 86-96. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2012.11.003>
- Lendvai, B., y Vizi, E. S. (2008). Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. *Physiological reviews*, 88(2), 333-349. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00040.2006>
- Lentz, T., Burrage, T., Smith, A., Crick, J., y Tignor, G. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science*, 215, 182-184.

- Lentz, T., Hawrot, E., y Wilson, P. (1987). Synthetic Peptides Corresponding to Sequences of Snake Venom Neurotoxins and Rabies Virus Glycoprotein Bind to the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 2, 298-307.
- Letarov, A. V., Babenko, V. V., y Kulikov, E. E. (2021). Free SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Particles May Play a Role in the Pathogenesis of COVID-19 Infection. *Biochemistry (Moscow)*, 86(3), 257-261. <https://doi.org/10.1134/S0006297921030032>
- Levene, P. A., y Alsberg, C. L. (1906). The Cleavage Products of Vitellin. *Journal of Biological Chemistry*, 2(1), 127-133. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46054-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46054-6)
- Levine, D. N. (2007). Sherrington's «The Integrative action of the nervous system»: a centennial appraisal. *Journal of the neurological sciences*, 253(1-2), 1-6. <https://doi.org/10.1016/J.JNS.2006.12.002>
- Levitan, I. B. (1994). MODULATION OF ION CHANNELS BY PROTEIN PHOSPHORYLATION AND DEPHOSPHORYLATION. *Annual review of physiology*, 56, 193-212. www.annualreviews.org
- Li, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, 3, 237-261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- Li, L., Xiong, W.-C., y Mei, L. (2018). Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annual Review of Physiology*, 80, 159-188. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516>
- Li, S., Li, Z. X., Pei, L., Le, A. D., y Liu, F. (2012). The $\alpha 7$ nACh-NMDA receptor complex is involved in cue-induced reinstatement of nicotine seeking. *The Journal of experimental medicine*, 209(12), 2141-2147. <https://doi.org/10.1084/JEM.20121270>
- Liu, C., Mendonça, L., Yang, Y., Gao, Y., Shen, C., Liu, J., Ni, T., Ju, B., Liu, C., Tang, X., Wei, J., Ma, X., Zhu, Y., Liu, W., Xu, S., Liu, Y., Yuan, J., Wu, J., Liu, Z., ... Zhang, P. (2020). The Architecture of Inactivated SARS-CoV-2 with Postfusion Spikes Revealed by Cryo-EM and Cryo-ET. *Structure*, 28(11), 1218-1224.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.10.001>
- Lodzki, M., Godin, B., Rakou, L., Mechoulam, R., Gallily, R., y Touitou, E. (2003). Cannabidiol—transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *Journal of Controlled Release*, 93(3), 377-387. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2003.09.001>
- Loring, R. H. (2022). Speculation on How RIC-3 and Other Chaperones Facilitate $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Folding and Assembly. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(14). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27144527>
- Lozovaya, N., Yatsenko, N., Beketov, A., Tsintsadze, T., y Burnashev, N. (2005). Glycine receptors in CNS neurons as a target for nonretrograde action of cannabinoids. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(33), 7499-7506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0977-05.2005>
- Lu, H. C., y Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 6(6), 607-615. <https://doi.org/10.1016/J.BPSC.2020.07.016>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565-574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Lynagh, T., y Lynch, J. W. (2012). Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(MAY 2012), 60. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2012.00060/BIBTEX>
- Lynagh, T., y Pless, S. A. (2014). Principles of agonist recognition in Cys-loop receptors. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2014.00160>
- Maelicke, A., y Albuquerque, E. X. (2000). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology*, 393(1-3), 165-170. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00093-5)
- Mahgoub, M., Keun-Hang, S. Y., Sydorenko, V., Ashoor, A., Kabbani, N., Al Kury, L., Sadek, B., Howarth, C. F., Isaev, D., Galadari, S., y Oz, M. (2013). Effects of cannabidiol on the function of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *European journal of pharmacology*, 720(1-3), 310-319. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2013.10.011>
- Mallozzi, C., Crestini, A., D'Amore, C., Piscopo, P., Cappella, M., Perrone, F., Talarico, G., Bruno, G., Vanacore, N., y Confaloni, A. (2020). Activation of Tyrosine Phosphorylation Signaling in Erythrocytes of Patients with Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 433, 36-41. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2020.02.050>
- Margiottat, J. F., Bergs, D. K., y Dionnet, V. E. (1987). Cyclic AMP regulates the proportion of functional acetylcholine receptors on chicken ciliary ganglion neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(22), 8155-8159.
- Martin, A. O., Alonso, G., y Guérineau, N. C. (2005). Agrin mediates a rapid switch from electrical coupling to chemical neurotransmission during synaptogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 169(3), 503-514. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411054>
- Matsuyama, S., y Taguchi, F. (2009). Two-Step Conformational Changes in a Coronavirus Envelope Glycoprotein Mediated by Receptor Binding and Proteolysis. *Journal of Virology*, 83(21), 11133-11141. <https://doi.org/10.1128/jvi.00959-09>
- Maus, A. D. J., Pereira, E. F. R., Karachunski, P. I., Horton, R. M., Navaneetham, D., Macklin, K., Cortes, W. S., Albuquerque, E. X., y Conti-Fine, B. M. (1998). Human and rodent

- bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology*, 54(5), 779-788. <https://doi.org/10.1124/MOL.54.5.779>
- McCormack, T. J., Melis, C., Colón, J., Gay, E. A., Mike, A., Karoly, R., Lamb, P. W., Molteni, C., y Yakel, J. L. (2010). Rapid desensitization of the rat $\alpha 7$ nAChR is facilitated by the presence of a proline residue in the outer β -sheet. *The Journal of Physiology*, 588(22), 4415-4429. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2010.195495>
- McGuire, P., Robson, P., Cubala, W. J., Vasile, D., Morrison, P. D., Barron, R., Taylor, A., y Wright, S. (2018). Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *The American journal of psychiatry*, 175(3), 225-231. <https://doi.org/10.1176/APPI.AJP.2017.17030325>
- McPartland, J. M., Duncan, M., Di Marzo, V., y Pertwee, R. G. (2015). Are cannabidiol and $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *British journal of pharmacology*, 172(3), 737-753. <https://doi.org/10.1111/BPH.12944>
- Mechoulam, R. (2016). Cannabis - the Israeli perspective. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 27(3), 181-187. <https://doi.org/10.1515/JBCPP-2015-0091>
- Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., y Hanuš, L. O. (2007). Cannabidiol-- recent advances. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1678-1692. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200790147>
- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., y Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*, 395(10229), 1033-1034. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
- Middleton, P., Jaramillo, F., y Schuetze, S. M. (1986). Forskolin increases the rate of acetylcholine receptor desensitization at rat soleus endplates. *Neurobiology*, 83(13), 4967-4971.
- Middleton, P., Rubin, L. L., y Schuetze, S. M. (1988). Desensitization of Acetylcholine Receptors in Rat Myotubes Is Enhanced by Agents That Elevate Intracellular CAMP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(9), 3405-3412.
- Mielke, J. G., y Mealing, G. A. R. (2009). Cellular distribution of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit in rat hippocampus. *Neuroscience Research*, 65(3), 296-306. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.08.003>
- Miles, K., Anthony, D. T., Rubino, L. L., Greengard, P., y Huganir, R. L. (1987). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor phosphorylation in rat myotubes by forskolin and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(18), 6591-6595.
- Miller, P. S., y Aricescu, A. R. (2014). Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature*, 512(7514), 270-275. <https://doi.org/10.1038/NATURE13293>

- Miller, P. S., y Smart, T. G. (2010). Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 31(4), 161-174.
<https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2009.12.005>
- Millet, T., Roger, P. L., Eran, N., Yael, B.-D., Tehila, M., y Talma, B. (2017). Role of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and RIC-3 in the Cholinergic Anti-inflammatory Pathway. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 17(2).
<https://doi.org/10.2174/1871524916666160829114533>
- Minguez-Viñas, T., Nielsen, B. E., Shoemark, D. K., Gotti, C., Sessions, R. B., Mulholland, A. J., Bouzat, C., Wonnacott, S., Gallagher, T., Bermudez, I., y Oliveira, A. S. (2021). A conserved arginine with non-conserved function is a key determinant of agonist selectivity in $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors. *British Journal of Pharmacology*, 178(7), 1651-1668. <https://doi.org/10.1111/BPH.15389>
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., y Sakmann, B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature*, 321, 406-411.
- Mittaud, P., Camilleri, A. A., Willmann, R., Erb-Vöggtli, S., Burden, S. J., y Fuhrer, C. (2004). A Single Pulse of Agrin Triggers a Pathway That Acts To Cluster Acetylcholine Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 24(18), 7841-7854.
<https://doi.org/10.1128/mcb.24.18.7841-7854.2004>
- Miyara, M., Tubach, F., Pourcher, V., Morélot-Panzini, C., Pernet, J., Haroche, J., Lebbah, S., Morawiec, E., Gorochoy, G., Caumes, E., Hausfater, P., Combes, A., Similowski, T., y Amoura, Z. (2022). Lower Rate of Daily Smokers With Symptomatic COVID-19: A Monocentric Self-Report of Smoking Habit Study. *Frontiers in Medicine*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.668995>
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., y Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 423(6943), 949-955.
<https://doi.org/10.1038/NATURE01748>
- Mizrachi, T., Vaknin-Dembinsky, A., Brenner, T., y Treinin, M. (2021). Neuroinflammation Modulation via $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and Its Chaperone, RIC-3. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(20).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26206139>
- Monod, J., Wyman, J., y Changeux, J. P. (1965). ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *Journal of molecular biology*, 12(1), 88-118.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6)
- Moorhead, G. B. G., De Wever, V., Templeton, G., y Kerk, D. (2009). Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochemical Journal*, 417(2), 401-409.
<https://doi.org/10.1042/BJ20081986>
- Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M., y Hibbs, R. E. (2016). X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature* 2016 538:7625, 538(7625), 411-415.
<https://doi.org/10.1038/nature19785>

- Moroni, M., Zwart, R., Sher, E., Cassels, B. K., y Bermudez, I. (2006). $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Molecular pharmacology*, *70*(2), 755-768. <https://doi.org/10.1124/MOL.106.023044>
- Moss, S. J., Mcdonald, B. J., Rudhard, Y., y Schoepfer, R. (1996). Phosphorylation of the Predicted Major Intracellular Domains of the Rat and Chick Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ Subunit by CAMP-dependent Protein Kinase. *Neuropharmacology*, *35*(8), 1023-1028.
- Mukhtasimova, N., Lee, W. Y., Wang, H. L., y Sine, S. M. (2009). Detection and trapping of intermediate states priming nicotinic receptor channel opening. *Nature*, *459*(7245), 451-454. <https://doi.org/10.1038/nature07923>
- Mulle, C., Benoit, P., Pinset, C., Roa, M., y Changeux, J.-P. (1988). Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(15), 5728-5732.
- Nau, J., Luthra, P., Lanzer, K., Szaba, F., Cookenham, T., Carlson, E., y Authors' Affiliations, P. (2021). Varenicline Prevents SARS-CoV-2 Infection In Vitro and in Rhesus Macaques. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.06.29.450426>
- Neher, E., y Steinbach, J. H. (1978). Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *The Journal of physiology*, *277*(1), 153-176. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1978.SP012267>
- Nemecz, Á., Prevost, M. S., Menny, A., y Corringer, P. J. (2016). Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron*, *90*(3), 452-470. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.03.032>
- Newman, E. L., Gupta, K., Climer, J. R., Monaghan, C. K., y Hasselmo, M. E. (2012). Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *6*(JUNE). <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2012.00024>
- Ni, M., Yang, Z. W., Li, D. J., Li, Q., Zhang, S. H., Su, D. F., Xie, H. H., y Shen, F. M. (2010). A potential role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in cardiac angiogenesis in a pressure-overload rat model. *Journal of pharmacological sciences*, *114*(3), 311-319. <https://doi.org/10.1254/JPHS.09335FP>
- Nielsen, B. E., Bermudez, I., y Bouzat, C. (2019). Flavonoids as positive allosteric modulators of $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Neuropharmacology*, *160*, 107794. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.107794>
- Nielsen, B. E., Minguez, T., Bermudez, I., y Bouzat, C. (2018). Molecular function of the novel $\alpha 7\beta 2$ nicotinic receptor. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *75*(13), 2457-2471. <https://doi.org/10.1007/S00018-017-2741-4>
- Nishioka, T., Tada, H., Ibaragi, S., Chen, C., y Sasano, T. (2019). Nicotine exposure induces the proliferation of oral cancer cells through the $\alpha 7$ subunit of the nicotinic

- acetylcholine receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 509(2), 514-520. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.154>
- Nishizaki, T., Nomura, T., Matsuoka, T., Enikolopov, G., y Sumikawa, K. (1999). Arachidonic acid induces a long-lasting facilitation of hippocampal synaptic transmission by modulating PKC activity and nicotinic ACh receptors. *Brain research. Molecular brain research*, 69(2), 263-272.
- Nishizaki, T., Nomura, T., Matuoka, T., Kondoh, T., Enikolopo, G., Sumikawa, K., Watabe, S., Shiotani, T., y Yoshii, M. (2000). The anti-dementia drug nefiracetam facilitates hippocampal synaptic transmission by functionally targeting presynaptic nicotinic ACh receptors. *Brain research. Molecular brain research*, 80(1), 53-62. www.elsevier.com/locate/bres
- Noviello, C. M., Gharpure, A., Mukhtasimova, N., Cabuco, R., Baxter, L., Borek, D., Sine, S. M., y Hibbs, R. E. (2021). Structure and gating mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Cell*, 184(8), 2121-2134.e13. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.02.049>
- Ogata, A. F., Maley, A. M., Wu, C., Gilboa, T., Norman, M., Lazarovits, R., Mao, C.-P., Newton, G., Chang, M., Nguyen, K., Kamkaew, M., Zhu, Q., Gibson, T. E., Ryan, E. T., Charles, R. C., Marasco, W. A., y Walt, D. R. (2020). Ultra-Sensitive Serial Profiling of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies in Plasma to Understand Disease Progression in COVID-19 Patients with Severe Disease. *Clinical Chemistry*, 66(12), 1562-1572. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa213>
- Ohta, K., Miyamoto, H., Yaguchi, T., Nagai, K., Yamamoto, S., Nomura, T., Tanaka, A., y Nishizaki, T. (2003). Stearic acid facilitates hippocampal neurotransmission by enhancing nicotinic ACh receptor responses via a PKC pathway. *Brain research. Molecular brain research*, 119(1), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2003.08.017>
- Okamura, Y., Nishino, A., Murata, Y., Nakajo, K., Iwasaki, H., Ohtsuka, Y., Tanaka-Kunishima, M., Takahashi, N., Hara, Y., Yoshida, T., Nishida, M., Okado, H., Watari, H., Meinertzhagen, I. A., Satoh, N., Takahashi, K., Satou, Y., Okada, Y., y Mori, Y. (2005). Comprehensive analysis of the ascidian genome reveals novel insights into the molecular evolution of ion channel genes. *Physiological genomics*, 22(3), 269-282. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00229.2004>
- Oliveira, A. S. F., Ibarra, A. A., Bermudez, I., Casalino, L., Gaieb, Z., Shoemark, D. K., Gallagher, T., Sessions, R. B., Amaro, R. E., y Mulholland, A. J. (2021). A potential interaction between the SARS-CoV-2 spike protein and nicotinic acetylcholine receptors. *Biophysical Journal*, 120(6), 983-993. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.01.037>
- Olsen, J. V., y Mann, M. (2013). Status of large-scale analysis of posttranslational modifications by mass spectrometry. *En Molecular and Cellular Proteomics* (Vol. 12, Número 12, pp. 3444-3452). <https://doi.org/10.1074/mcp.0113.034181>

- Oz, M., Ravindran, A., Diaz-Ruiz, O., Zhang, L., y Morales, M. (2003). The endogenous cannabinoid anandamide inhibits alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 306(3), 1003-1010. <https://doi.org/10.1124/JPET.103.049981>
- Oz, M., Zhang, L., y Morales, M. (2002). Endogenous cannabinoid, anandamide, acts as a noncompetitive inhibitor on 5-HT3 receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes. *Synapse (New York, N.Y.)*, 46(3), 150-156. <https://doi.org/10.1002/SYN.10121>
- Oz, M., Zhang, L., Ravindran, A., Morales, M., y Lupica, C. R. (2004). Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on alpha7-nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* Oocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310(3), 1152-1160. <https://doi.org/10.1124/JPET.104.067751>
- Palma, E., Bertrand, S., Binzoni, T., y Bertrand, D. (1996). Neuronal nicotinic alpha 7 receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *The Journal of physiology*, 491 (Pt 1)(Pt 1), 151-161. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1996.SP021203>
- Papke, R. L. (2014). Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical pharmacology*, 89(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2014.01.029>
- Papke, R. L., Bagdas, D., Kulkarni, A. R., Gould, T., Alsharari, S. D., Thakur, G. A., y Damaj, M. I. (2015). The analgesic-like properties of the alpha7 nAChR silent agonist NS6740 is associated with non-conducting conformations of the receptor. *Neuropharmacology*, 91, 34-42. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2014.12.002>
- Papke, R. L., y Lindstrom, J. M. (2020). Nicotinic acetylcholine receptors: Conventional and unconventional ligands and signaling. *Neuropharmacology*, 168, 108021. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2020.108021>
- Parada, E., Egea, J., Buendia, I., Negredo, P., Cunha, A. C., Cardoso, S., Soares, M. P., y López, M. G. (2013). The Microglial α 7-Acetylcholine Nicotinic Receptor Is a Key Element in Promoting Neuroprotection by Inducing Heme Oxygenase-1 via Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(11), 1135. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.4671>
- Paradiso, K., y Brehm, P. (1998). Long-Term Desensitization of Nicotinic Acetylcholine Receptors Is Regulated via Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(22), 9227-9237.
- Park, H. J., Lee, P. H., Ahn, Y. W., Choi, Y. J., Lee, G., Lee, D. Y., Chung, E. S., y Jin, B. K. (2007). Neuroprotective effect of nicotine on dopaminergic neurons by anti-inflammatory action. *The European journal of neuroscience*, 26(1), 79-89. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2007.05636.X>

- Parrish, W. R., Rosas-Ballina, M., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, M., Ochani, K., Yang, L. H., Hudson, L. Q., Lin, X., Patel, N., Johnson, S. M., Chavan, S., Goldstein, R. S., Czura, C. J., Miller, E. J., Al-Abed, Y., Tracey, K. J., y Pavlov, V. A. (2008). Modulation of TNF release by choline requires $\alpha 7$ subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Molecular Medicine*, *14*(9-10), 567-574. <https://doi.org/10.2119/2008-00079.Parrish>
- Paulo, J. A., Brucker, W. J., y Hawrot, E. (2009). Proteomic analysis of an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor interactome. *Journal of Proteome Research*, *8*(4), 1849-1858. <https://doi.org/10.1021/pr800731z>
- Pavlov, V. A., y Tracey, K. J. (2012). The vagus nerve and the inflammatory reflex - Linking immunity and metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, *8*(12), 743-754. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.189>
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., y Baltimore, D. (1993a). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*, 8392-8396. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8392>
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., y Baltimore, D. (1993b). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(18), 8392-8396. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.18.8392>
- Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W., y Luo, J. (2022). A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, *130*(4), 439-456. <https://doi.org/10.1111/BCPT.13710>
- Pepper, C., Tu, H., Morrill, P., Garcia-Rates, S., Fegan, C., y Greenfield, S. (2017). Tumor cell migration is inhibited by a novel therapeutic strategy antagonizing the alpha-7 receptor. *Oncotarget*, *8*(7), 11414-11424. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.14545>
- Pereira, E. F. R., Hilmas, C., Santos, M. D., Alkondon, M., Maelicke, A., y Albuquerque, E. X. (2002). Unconventional Ligands and Modulators of Nicotinic Receptors. *Journal of Neurobiology*, *53*, 479-500. <https://doi.org/10.1002/neu.10146>
- Perluigi, M., Barone, E., Di Domenico, F., y Butterfield, D. A. (2016). Aberrant protein phosphorylation in Alzheimer disease brain disturbs pro-survival and cell death pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1862*(10), 1871-1882. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2016.07.005>
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Di Marzo, V., Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., y Ross, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacological reviews*, *62*(4), 588-631. <https://doi.org/10.1124/PR.110.003004>
- Pestana, I. A., Vazquez-Padron, R. I., Aitouche, A., y Pham, S. M. (2005). Nicotinic and PDGF-receptor function are essential for nicotine-stimulated mitogenesis in human

- vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(5), 986-995.
<https://doi.org/10.1002/jcb.20564>
- Peters, J. A., Cooper, M. A., Carland, J. E., Livesey, M. R., Hales, T. G., y Lambert, J. J. (2010). Novel structural determinants of single channel conductance and ion selectivity in 5-hydroxytryptamine type 3 and nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of physiology*, 588(Pt 4), 587-596. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2009.183137>
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., y Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116-129. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.08.036>
- Pinheiro, N. M., Santana, F. P. R., Almeida, R. R., Guerreiro, M., Martins, M. A., Caperuto, L. C., Câmara, N. O. S., Wensing, L. A., Prado, V. F., Tiberio, I. F. L. C., Prado, M. A. M., y Prado, C. M. (2017). Acute lung injury is reduced by the $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. *FASEB Journal*, 31(1), 320-332. <https://doi.org/10.1096/fj.201600431R>
- Poisik, O. V., Shen, J. X., Jones, S., y Yakel, J. L. (2008). Functional $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors localize to cell bodies and proximal dendrites in the rat substantia nigra pars reticulata. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 5), 1365. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2008.149963>
- Pollock, V. V., Pastoor, T., Katnik, C., Cuevas, J., y Wecker, L. (2009). Cyclic AMP-dependent protein kinase A and protein kinase C phosphorylate $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor subunits at distinct stages of receptor formation and maturation. *Neuroscience*, 158(4), 1311-1325. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.11.032>
- Pretzsch, C. M., Voinescu, B., Mendez, M. A., Wichers, R., Ajram, L., Ivin, G., Heasman, M., Williams, S., Murphy, D. G. M., Daly, E., y McAlonan, G. M. (2019). The effect of cannabidiol (CBD) on low-frequency activity and functional connectivity in the brain of adults with and without autism spectrum disorder (ASD). *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 33(9), 1141-1148. <https://doi.org/10.1177/0269881119858306>
- Pucci, S., Fasoli, F., Moretti, M., Benfante, R., Di Lascio, S., Viani, P., Daga, A., Gordon, T. J., McIntosh, M., Zoli, M., Clementi, F., y Gotti, C. (2021). Choline and nicotine increase glioblastoma cell proliferation by binding and activating $\alpha 7$ - and $\alpha 9$ - containing nicotinic receptors. *Pharmacological research*, 163. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.105336>
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., y Williams, S. M. (2001). *Neuroscience*. 1-2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/>
- Quick, M. W., y Lester, R. A. J. (2002). Desensitization of Neuronal Nicotinic Receptors. *Journal of Neurobiology*, 53(4), 457-478. <https://doi.org/10.1002/neu.10109>

- Rahman, M. M., Teng, J., Worrell, B. T., Noviello, C. M., Lee, M., Karlin, A., Stowell, M. H. B., y Hibbs, R. E. (2020). Structure of the Native Muscle-type Nicotinic Receptor and Inhibition by Snake Venom Toxins. *Neuron*, *106*(6), 952-962.e5. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2020.03.012>
- Ramazi, S., y Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods. En *Database* (Vol. 2021). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/database/baab012>
- Ren, C., Tong, Y. L., Li, J. C., Lu, Z. Q., y Yao, Y. M. (2017). The Protective Effect of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation on Critical Illness and Its Mechanism. *International journal of biological sciences*, *13*(1), 46-56. <https://doi.org/10.7150/IJBS.16404>
- Revah, F., Bertrand, D., Galzi, J. L., Devillers-Thiéry, A., Mulle, C., Hussy, N., Bertrand, S., Ballivet, M., y Changeux, J. P. (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature*, *353*(6347), 846-849. <https://doi.org/10.1038/353846A0>
- Role, L. W. (1984). Substance P modulation of acetylcholine-induced currents in embryonic chicken sympathetic and ciliary ganglion neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(9), 2924-2928.
- Rosas-Ballina, M., Ochani, M., Parrish, W. R., Ochani, K., Harris, Y. T., Huston, J. M., Chavan, S., y Tracey, K. J. (2008). Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(31), 11008-11013. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0803237105
- Rosenberg, M. M., Yang, F., Giovanni, M., Mohn, J. L., Temburni, M. K., y Jacob, M. H. (2008). Adenomatous polyposis coli plays a key role, in vivo, in coordinating assembly of the neuronal nicotinic postsynaptic complex. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *38*(2), 138-152. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.02.006>
- Ross, A., Rapuano, M., y Prives, J. (1988). Induction of Phosphorylation and Cell Surface Redistribution of Acetylcholine Receptors by Phorbol Ester and Carbamylcholine in Cultured Chick Muscle Cells. *The Journal of cell biology*, *107*(3), 1139-1145.
- Rothhut, B., Romano, S. J., Vijayaraghavan, S., y Berg, D. K. (1996). Post-Translational Regulation of Neuronal Acetylcholine Receptors Stably Expressed in a Mouse Fibroblast Cell Line. *Journal of neurobiology*, *29*(1), 115-125.
- Rudell, J. B., y Ferns, M. J. (2013). Regulation of muscle acetylcholine receptor turnover by β subunit tyrosine phosphorylation. *Developmental Neurobiology*, *73*(5), 399-410. <https://doi.org/10.1002/dneu.22070>
- Russo, E. B. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & biodiversity*, *4*(8), 1614-1648. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200790144>
- Russo, P., Bonassi, S., Giacconi, R., Malavolta, M., Tomino, C., y Maggi, F. (2020). COVID-19 and smoking: Is nicotine the hidden link? En *European Respiratory Journal* (Vol. 55,

Número 6). European Respiratory Society.
<https://doi.org/10.1183/13993003.01116-2020>

- Safran, A., Sagi-Eisenberg, R., Neumann, D., y Fuchs, S. (1987). Phosphorylation of the Acetylcholine Receptor by Protein Kinase C and Identification of the Phosphorylation Site within the Receptor delta Subunit. *The Journal of biological chemistry*, 262(22), 10506-10510.
- Sait, L. G., Sula, A., Ghovanloo, M. R., Hollingworth, D., Ruben, P. C., y Wallace, B. A. (2020). Cannabidiol interactions with voltage-gated sodium channels. *eLife*, 9, 1-17. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.58593>
- Saito, A., Irie, T., Suzuki, R., Maemura, T., Nasser, H., Uriu, K., Kosugi, Y., Shirakawa, K., Sadamasu, K., Kimura, I., Ito, J., Wu, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Yamayoshi, S., Loeber, S., Tsuda, M., Wang, L., Ozono, S., ... Sato, K. (2022). Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. *Nature*, 602(7896), 300-306. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04266-9>
- San Martín, V. P., Sazo, A., Utreras, E., Moraga-Cid, G., y Yévenes, G. E. (2022). Glycine Receptor Subtypes and Their Roles in Nociception and Chronic Pain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.848642>
- Sauguet, L., Howard, R. J., Malherbe, L., Lee, U. S., Corringer, P. J., Adron Harris, R., y Delarue, M. (2013). Structural basis for potentiation by alcohols and anaesthetics in a ligand-gated ion channel. *Nature Communications* 2013 4:1, 4(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/ncomms2682>
- Sauguet, L., Shahsavari, A., Poitevin, F., Huon, C., Menny, A., Nemečz, À., Haouz, A., Changeux, J. P., Corringer, P. J., y Delarue, M. (2014). Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 966-971. https://doi.org/10.1073/PNAS.1314997111/SUPPL_FILE/SM03.MPG
- Schirmer, S. U., Eckhardt, I., Lau, H., Klein, J., DeGraaf, Y. C., Lips, K. S., Pineau, C., Gibbins, I. L., Kummer, W., Meinhardt, A., y Haberberger, R. V. (2011). The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. *Reproduction (Cambridge, England)*, 142(1), 157-166. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0302>
- Schroeder, W., Meyer, H. E., Buchner, K., Bayer, H., y Hucho, F. (1991). Phosphorylation Sites of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. A Novel Site Detected in Position delta S362. *Biochemistry*, 30(14), 3583-3588.
- Scuderi, C., De Filippis, D., Iuvone, T., Blasio, A., Steardo, A., y Esposito, G. (2009). Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytotherapy research : PTR*, 23(5), 597-602. <https://doi.org/10.1002/PTR.2625>
- Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A., y Patrick, J. W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *The Journal of neuroscience : the official*

- Journal of the Society for Neuroscience*, 13(2), 596-604.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-02-00596.1993>
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., y Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21), 11727-11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117/-/DCSupplemental>
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., y Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 581. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
- Sharma, G., y Vijayaraghavan, S. (2002). Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *Journal of neurobiology*, 53(4), 524-534. <https://doi.org/10.1002/NEU.10114>
- Shaw, S., Bencherif, M., y Marrero, M. B. (2002). Janus kinase 2, an early target of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection against Abeta-(1-42) amyloid. *The Journal of biological chemistry*, 277(47), 44920-44924. <https://doi.org/10.1074/JBC.M204610200>
- Shirato, K., y Kizaki, T. (2021). SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. *Heliyon*, 7(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06187>
- Shytle, R. D., Mori, T., Townsend, K., Vendrame, M., Sun, N., Zeng, J., Ehrhart, J., Silver, A. A., Sanberg, P. R., y Tan, J. (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *Journal of neurochemistry*, 89(2), 337-343. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2004.02347.X>
- Sigel, E., Baur, R., Rácz, I., Marazzi, J., Smart, T. G., Zimmer, A., y Gertsch, J. (2011). The major central endocannabinoid directly acts at GABA(A) receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), 18150-18155. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1113444108>
- Sine, S. M. (2002). The Nicotinic Receptor Ligand Binding Domain. *J Neurobiol*, 53, 431-446. <https://doi.org/10.1002/neu.10139>
- Sinkus, M. L., Graw, S., Freedman, R., Ross, R. G., Lester, H. A., y Leonard, S. (2015). The human CHRNA7 and CHRFA7A genes: A review of the genetics, regulation, and function. *Neuropharmacology*, 96(Pt B), 274-288. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2015.02.006>
- Smith, M. M., Merlie, J. P., y Lawrence, J. C. (1987). Regulation of phosphorylation of nicotinic acetylcholine receptors in mouse BC3H1 myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(18), 6601-6605.
- Soderstrom, K., Soliman, E., y Dross, R. Van. (2017). Cannabinoids Modulate Neuronal Activity and Cancer by CB1 and CB2 Receptor-Independent Mechanisms. *Frontiers in Pharmacology*, 8(OCT). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00720>

- Song, M., y Messing, R. O. (2005). Protein kinase C regulation of GABAA receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(2), 119-127. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4339-x>
- Spivak, C. E., Lupica, C. R., y Oz, M. (2007). The endocannabinoid anandamide inhibits the function of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology*, 72(4), 1024-1032. <https://doi.org/10.1124/MOL.107.036939>
- Spurny, R., Debaveye, S., Farinha, A., Veys, K., Vos, A. M., Gossas, T., Atack, J., Bertrand, S., Bertrand, D., Danielson, U. H., Tresadern, G., y Ulens, C. (2015). Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(19), E2543-E2552. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418289112>
- Sreevalsan, S., Joseph, S., Jutooru, I., Chadalapaka, G., y Safe, S. H. (2011). Induction of Apoptosis by Cannabinoids in Prostate and Colon Cancer Cells Is Phosphatase Dependent. *Anticancer Research*, 31(11), 3799. /pmc/articles/PMC3280884/
- Stallcup, W. B., y Patrick, J. (1980). Substance P enhances cholinergic receptor desensitization in a clonal nerve cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1), 634-638.
- Stokes, C., Treinin, M., y Papke, R. L. (2015). Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(8), 514-523. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2015.05.002>
- Stuckenholz, V., Bacher, M., Balzer-Geldsetzer, M., Alvarez-Fischer, D., Oertel, W. H., Dodel, R. C., y Noelker, C. (2013). The $\alpha 7$ nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice. *Journal of Parkinson's disease*, 3(2), 161-172. <https://doi.org/10.3233/JPD-120157>
- Sun, H., Hu, X. Q., Moradel, E. M., Weight, F. F., y Zhang, L. (2003). Modulation of 5-HT3 Receptor-mediated Response and Trafficking by Activation of Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34150-34157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303584200>
- Swope, S. L., Moss, S. J., Blackstone, C. D., y Huganir, R. L. (1992). Phosphorylation of ligand-gated ion channels: a possible mode of synaptic plasticity. *The FASEB Journal*, 6(8), 2514-2523.
- Takeda, M. (2022). Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. En *Microbiology and Immunology* (Vol. 66, Número 1, pp. 15-23). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12945>
- Talwar, S., y Lynch, J. W. (2014). Phosphorylation mediated structural and functional changes in pentameric ligand-gated ion channels: Implications for drug discovery. En *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 53, pp. 218-223). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.05.028>

- Taly, A., Corringer, P. J., Guedin, D., Lestage, P., y Changeux, J. P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery* 8:9, 8(9), 733-750. <https://doi.org/10.1038/nrd2927>
- Taly, A., Delarue, M., Grutter, T., Nilges, M., Le Novère, N., Corringer, P. J., y Changeux, J. P. (2005). Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism. *Biophysical journal*, 88(6), 3954-3965. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.104.050229>
- Tanmay, S., Labrou, D., Farsalinos, K., y Poulas, K. (2021). Is SARS-CoV-2 Spike glycoprotein impairing macrophage function via $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors? *Food and Chemical Toxicology*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112184>
- Tapper, A. R., McKinney, S. L., Nashmi, R., Schwarz, J., Deshpande, P., Labarca, C., Whiteaker, P., Marks, M. J., Collins, A. C., y Lester, H. A. (2004). Nicotine activation of $\alpha 4^*$ receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5698), 1029-1032. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1099420>
- Terunuma, M., Xu, J., Vithlani, M., Sieghart, W., Kittler, J., Pangalos, M., Haydon, P. G., Coulter, D. A., y Moss, S. J. (2008). Deficits in phosphorylation of GABAA receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie compromised synaptic inhibition during status epilepticus. *Journal of Neuroscience*, 28(2), 376-384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4346-07.2008>
- Thompson, A. J., Lester, H. A., y Lummis, S. C. R. (2010). The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Quarterly reviews of biophysics*, 43(4), 449-499. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000168>
- Thomsen, M. S., Zwart, R., Ursu, D., Jensen, M. M., Pinborg, L. H., Gilmour, G., Wu, J., Sher, E., y Mikkelsen, J. D. (2015). $\alpha 7$ and $\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits Form Heteromeric Receptor Complexes that Are Expressed in the Human Cortex and Display Distinct Pharmacological Properties. *PloS one*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0130572>
- Tillman, T. S., Chen, Q., Bondarenko, V., Coleman, J. A., Xu, Y., y Tang, P. (2023). SARS-CoV-2 Spike Protein Downregulates Cell Surface $\alpha 7$ nAChR through a Helical Motif in the Spike Neck. *ACS Chem. Neurosci*, 14(4), 689-698. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.2c00610>
- Toborek, M., Son, K. W., Pudelko, A., King-Pospisil, K., Wylegala, E., y Malecki, A. (2007). ERK 1/2 Signaling Pathway Is Involved in Nicotine-Mediated Neuroprotection in Spinal Cord Neurons. *Journal of Cellular Biochemistry*, 100(2), 279-292. <https://doi.org/10.1002/jcb.21013>
- Tsuneki, H., Kobayashi, S., Takagi, K., Kagawa, S., Tsunoda, M., Murata, M., Matsuoka, T., Wada, T., Kurachi, M., Kimura, I., y Sasaoka, T. (2007). Novel G423S mutation of human $\alpha 7$ nicotinic receptor promotes agonist-induced desensitization by a protein

- kinase C-dependent mechanism. *Molecular Pharmacology*, 71(3), 777-786.
<https://doi.org/10.1124/mol.106.030866>
- Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of molecular biology*, 346(4), 967-989.
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2004.12.031>
- Unwin, N. (2013). Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from Torpedo postsynaptic membranes. *Quarterly reviews of biophysics*, 46(4), 283-322.
<https://doi.org/10.1017/S0033583513000061>
- Uteshev, V. V. (2014). The therapeutic promise of positive allosteric modulation of nicotinic receptors. *European Journal of Pharmacology*, 727(1), 181-185.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.01.072>
- Varvel, S. A., Wiley, J. L., Yang, R., Bridgen, D. T., Long, K., Lichtman, A. H., y Martin, B. R. (2006). Interactions between THC and cannabidiol in mouse models of cannabinoid activity. *Psychopharmacology*, 186(2), 226-234. <https://doi.org/10.1007/S00213-006-0356-9/TABLES/3>
- Venne, A. S., Kollipara, L., y Zahedi, R. P. (2014). The next level of complexity: Crosstalk of posttranslational modifications. En *Proteomics* (Vol. 14, Números 4-5, pp. 513-524). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300344>
- Vijayaraghavan, S., Schmid, H. A., Halvorsen, S. W., y Berg, D. K. (1990). Cyclic AMP-Dependent Phosphorylation of a Neuronal Acetylcholine Receptor alpha-Type Subunit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(10), 3255-3262.
- Viseshakul, N., Figl, A., Lytle, C., y Cohen, B. N. (1998). The alpha4 subunit of rat alpha4beta2 nicotinic receptors is phosphorylated in vivo. *Brain research. Molecular brain research*, 59(1), 100-104.
- Vitale, R. M., Iannotti, F. A., y Amodeo, P. (2021). The (Poly)Pharmacology of Cannabidiol in Neurological and Neuropsychiatric Disorders: Molecular Mechanisms and Targets. *International journal of molecular sciences*, 22(9).
<https://doi.org/10.3390/IJMS22094876>
- Wagner, K., Edson, K., Heginbotham, L., Post, M., Haganir, R. L., y Czernik, A. J. (1991). Determination of the Tyrosine Phosphorylation Sites of the Nicotinic. *The Journal of biological chemistry*, 266(35), 237-238.
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., y Veessler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, H. L., Toghraee, R., Papke, D., Cheng, X. L., McCammon, J. A., Ravaioli, U., y Sine, S. M. (2009). Single-Channel Current Through Nicotinic Receptor Produced by Closure of Binding Site C-Loop. *Biophysical Journal*, 96(9), 3582.
<https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2009.02.020>

- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amelia, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, N., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J., y Tracey, K. J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, *421*(6921), 384-388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>
- Wang, K., Hackett, J. T., Cox, M. E., Van Hoek, M., Lindstrom, J. M., y Parsons, S. J. (2004). Regulation of the Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor by Src Family Tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(10), 8779-8786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309652200>
- Wang, N., Orr-Urtreger, A., y Korczyn, A. D. (2002). The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autonomic ganglia: lessons from knockout mice. *Progress in Neurobiology*, *68*(5), 341-360.
- Wang, Q., y Lynch, J. W. (2011). Activation and Desensitization Induce Distinct Conformational Changes at the Extracellular-Transmembrane Domain Interface of the Glycine Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38814. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.273631>
- Watkins, A. R. (2019). Cannabinoid interactions with ion channels and receptors. *Channels*, *13*(1), 162-167. <https://doi.org/10.1080/19336950.2019.1615824>
- Wecker, L., Pollock, V. V., Pacheco, M. A., y Pastoor, T. (2010). Nicotine-induced up regulation of $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors is mediated by the protein kinase c-dependent phosphorylation of $\alpha 4$ subunits. *Neuroscience*, *171*(1), 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.005>
- Wessler, I., y Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*, *154*(8), 1558-1571. <https://doi.org/10.1038/BJP.2008.185>
- Wiesner, A., y Fuhrer, C. (2006). Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine kinases in the peripheral and central nervous system: Same players, different roles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *63*(23), 2818-2828. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6081-z>
- Williams, D. K., Wang, J., y Papke, R. L. (2011). Investigation of the molecular mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator PNU-120596 provides evidence for two distinct desensitized states. *Molecular pharmacology*, *80*(6), 1013-1032. <https://doi.org/10.1124/MOL.111.074302>
- Williams, M. E., Burton, B., Urrutia, A., Shcherbatko, A., Chavez-Noriega, L. E., Cohen, C. J., y Aiyar, J. (2005). Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, *280*(2), 1257-1263. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410039200>
- Wonnacott, S., y Barik, J. (2007). Nicotinic ACh Receptors. *Tocris Reviews*, *28*. <https://researchportal.bath.ac.uk/en/publications/nicotinic-ach-receptors>
- Wu, C. H., Lee, C. H., y Ho, Y. S. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor-based blockade: applications of molecular targets for cancer therapy. *Clinical cancer research : an*

- official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(11), 3533-3541.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2434>
- Wu, J., Liu, Q., Tang, P., Mikkelsen, J. D., Shen, J., Whiteaker, P., y Yakel, J. L. (2016). Heteromeric $\alpha 7\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain. *Trends in pharmacological sciences*, 37(7), 562-574.
<https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2016.03.005>
- Wu, Z., y McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 323(13), 1239-1242. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.2648>
- Xiong, W., Cheng, K., Cui, T., Godlewski, G., Rice, K. C., Xu, Y., y Zhang, L. (2011). Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. *Nature chemical biology*, 7(5), 296-303.
<https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.552>
- Xiong, W., Cui, T., Cheng, K., Yang, F., Chen, S. R., Willenbring, D., Guan, Y., Pan, H. L., Ren, K., Xu, Y., y Zhang, L. (2012). Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. *The Journal of experimental medicine*, 209(6), 1121-1134. <https://doi.org/10.1084/JEM.20120242>
- Xiong, W., Koo, B. N., Morton, R., y Zhang, L. (2011). Psychotropic and nonpsychotropic cannabis derivatives inhibit human 5-HT(3A) receptors through a receptor desensitization-dependent mechanism. *Neuroscience*, 184, 28-37.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.03.066>
- Xu, F., Satoh, E., y Iijima, T. (2003). Protein kinase C-mediated Ca^{2+} entry in HEK 293 cells transiently expressing human TRPV4. *British Journal of Pharmacology*, 140(2), 413. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0705443>
- Xu, H., Wang, Y., Lin, S., Deng, W., Peng, D., Cui, Q., y Xue, Y. (2018). PTMD: A Database of Human Disease-associated Post-translational Modifications. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 16(4), 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.06.004>
- Xu, J., Zhu, Y., y Heinemann, S. F. (2006). Identification of Sequence Motifs That Target Neuronal Nicotinic Receptors to Dendrites and Axons. *The Journal of Neuroscience*, 26(38), 9780. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0840-06.2006>
- Yamodo, I. H., Chiara, D. C., Cohen, J. B., y Miller, K. W. (2010). Conformational Changes in the Nicotinic Acetylcholine Receptor During Gating and Desensitization. *Biochemistry*, 49(1), 156. <https://doi.org/10.1021/BI901550P>
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., y Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 Downloaded from. *En Science* (Vol. 367). <http://science.sciencemag.org/>
- Yang, K. H., Galadari, S., Isaev, D., Petroianu, G., Shippenberg, T. S., y Oz, M. (2010). The nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol inhibits 5-hydroxytryptamine $3A$ receptor-mediated currents in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of pharmacology*

- and experimental therapeutics*, 333(2), 547-554.
<https://doi.org/10.1124/JPET.109.162594>
- 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 Pharmaceutica Sinica B*, 7(6), 611-622. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2017.09.001>
- Yang, Z., Aubrey, K. R., Alroy, I., Harvey, R. J., Vandenberg, R. J., y Lynch, J. W. (2008). Subunit-specific modulation of glycine receptors by cannabinoids and N-arachidonyl-glycine. *Biochemical pharmacology*, 76(8), 1014-1023.
<https://doi.org/10.1016/J.BCP.2008.07.037>
- Yees, G. H., y Haganir, R. L. (1987). Determination of the Sites of CAMP-dependent Phosphorylation on the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *The Journal of biological chemistry*, 262(34), 16748-16753.
- Yevenes, G. E., y Zeilhofer, H. U. (2011). Allosteric modulation of glycine receptors. *British journal of pharmacology*, 164(2), 224-236. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2011.01471.X>
- Young, G. T., Zwart, R., Walker, A. S., Sher, E., y Millar, N. S. (2008a). Potentiation of 7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14686-14691. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804372105
- Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E., Tomkins-Tinch, C., Nyalile, T. P., Wang, Y., Baum, A., Diehl, W. E., Dauphin, A., Carbone, C., Veinotte, K., Egri, S. B., Schaffner, S. F., Lemieux, J. E., Munro, J. B., Rafique, A., Barve, A., Sabeti, P. C., Kyratsous, C. A., ... Luban, J. (2020). Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *Cell*, 183(3), 739-751.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.032>
- Zanardi, A., Leo, G., Biagini, G., y Zoli, M. (2002). Nicotine and neurodegeneration in ageing. *Toxicology Letters*, 127(1-3), 207-215. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00502-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00502-1)
- Zanetti, S. R., Ziblat, A., Torres, N. I., Zwirner, N. W., y Bouzat, C. (2016). Expression and Functional Role of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor in Human Cytokine-stimulated Natural Killer (NK) Cells. *The Journal of biological chemistry*, 291(32), 16541-16552.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M115.710574>
- Zdanowski, R., Krzyzowska, M., Ujazdowska, D., Lewicka, A., y Lewicki, S. (2015). Role of $\alpha 7$ nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. *Central-European Journal of Immunology*, 40(3), 373.
<https://doi.org/10.5114/CEJI.2015.54602>
- Zhang, J., Xue, F., Liu, Y., Yang, H., y Wang, X. (2013a). The structural mechanism of the Cys-loop receptor desensitization. *Molecular neurobiology*, 48(1), 97-108.
<https://doi.org/10.1007/S12035-013-8420-Z>

- Zhang, L., Jackson, C. B., Mou, H., Ojha, A., Peng, H., Quinlan, B. D., Rangarajan, E. S., Pan, A., Vanderheiden, A., Suthar, M. S., Li, W., Izard, T., Rader, C., Farzan, M., y Choe, H. (2020). SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nature Communications*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19808-4>
- Zhao, Y. (2016). The Oncogenic Functions of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Journal of Oncology*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9650481>
- Zhao, Y., Liu, S., Zhou, Y., Zhang, M., Chen, H., Eric Xu, H., Sun, D., Liu, L., y Tian, C. (2021). Structural basis of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor activation. *Cell Research* 2021 31:6, 31(6), 713-716. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00509-6>
- Zheng, Y., Zhao, J., Li, J., Guo, Z., Sheng, J., Ye, X., Jin, G., Wang, C., Chai, W., Yan, J., Liu, D., y Liang, X. (2021). SARS-CoV-2 spike protein causes blood coagulation and thrombosis by competitive binding to heparan sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 1124-1129. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.112>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579, 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Zoli, M., Pistillo, F., y Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. En *Neuropharmacology* (Vol. 96, Número PB, pp. 302-311). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.003>
- Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., y Gotti, C. (2018). Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current neuropharmacology*, 16(4), 338-349. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170912110450>
- Zwart, R., De Filippi, G., Broad, L. M., McPhie, G. I., Pearson, K. H., Baldwinson, T., y Sher, E. (2002). 5-Hydroxyindole potentiates human $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology*, 43(3), 374-384. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00094-1)

ABREVIATURAS Y SIGLAS

τ_{burst} : duración media de los *bursts*.

$\tau_{cluster}$: duración media de los *clusters*.

$\tau_{crítico}$: tiempo crítico.

τ_{open} : duración media de las aperturas aisladas.

$[Ca^{2+}]_i$: concentración intracelular de calcio.

2-AG: 2-araquidonoil glicerol (del inglés: *2-Arachidonoyl Glycerol*).

5-HI: 5-hidroxiindol.

5-HT: serotonina o 5-hidroxitriptamina (del inglés: *5-HydroxyTryptamine*).

5-HT₃R: receptor de serotonina tipo 3 (del inglés: *5-HydroxyTryptamine 3 Receptor*).

5-HT_{3A}R: receptor de serotonina tipo 3 subtipo A (del inglés: *5-HydroxyTryptamine 3A Receptor*).

8-Br-cAMP: 8-Bromo-adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (del inglés: *8-Bromo-adenosine-3',5'-cyclic monophosphate*).

ACE2: enzima convertidora de angiotensina 2 (del inglés: *Angiotensin-Converting Enzyme 2*).

ACh: acetilcolina (del inglés: *AcetylCholine*).

AChBP: proteína unidora de acetilcolina (del inglés: *Acetylcholine Binding Protein*).

ADNc: ADN complementario.

AEA: anandamida o N-araquidonoiletanolamina (del inglés: *N-ArachidonoylEthanolAmine*).

AMPC: adenosín monofosfato cíclico (del inglés: *Cyclic Adenosine MonoPhosphate*).

ATP: adenosín trifosfato (del inglés: *Adenosine TriPhosphate*).

BOSC23: célula embrionaria de riñón humano derivada HEK-293.

CB1R: receptor cannabinoide de tipo 1 (del inglés: *CannaBinoid Receptor type 1*).

CB2R: receptor cannabinoide de tipo 2 (del inglés: *CannaBinoid Receptor type 2*).

CBD: cannabidiol.

CBR: receptor cannabinoide (del inglés: *CannaBinoid Receptor*).

CE₅₀: concentración efectiva media.

CI₅₀: concentración inhibitoria media.

CKII: caseína quinasa II (del inglés: *Casein Kinase 2*).

COVID-19: enfermedad por coronavirus 2019 (del inglés: *Coronavirus Disease 2019*).

DA: dopamina.

DMEM: medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

DMSO: dimetilsulfóxido.

ECD: dominio extracelular (del inglés: *ExtraCellular Domain*).

ECS: solución extracelular (del inglés: *ExtraCellular Solution*).

ELIC: canal iónico activado por ligando de *Erwinia chrysanthemi* (del inglés: *Erwinia Ligand-gated Ion Channel*).

ERK 1/2: quinasa ERK 1/2 (del inglés: *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2*).

F: intensidad de fluorescencia relativa.

FCM: motivo de escisión por furina (del inglés: *Furin Cleavage Motif*).

FP: péptido hidrofóbico de fusión (del inglés: *Fusion Peptide*).

GABA: ácido γ -aminobutírico (del inglés: *Gamma-AminoButyric Acid*).

GABA_AR: receptor de GABA tipo A (del inglés: *GABA A Receptor*).

GABA_BR: receptor de GABA tipo B (del inglés: *GABA B Receptor*).

GFP: proteína fluorescente verde (del inglés: *Green Fluorescence Protein*).

GLIC: canal iónico activado por ligando de *Gloeobacter violaceus* (del inglés: *Gloeobacter Ligand-gated Ion Channel*).

Glu: glutamato.

Gly: glicina (del inglés: *Glycine*).

GlyR: receptor de glicina (del inglés: *Glycine Receptor*).

Gö-6983: 3-[1-[3-(Dimetilamino)propil]-5-metoxi-1H-indol-3-il]-4-(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona.

GPCR: receptor acoplado a proteína G (del inglés: *G-Protein Coupled Receptor*).

HEK293: célula embrionaria de riñón humano 293 (del inglés: *Human Embryonic Kidney 293*).

ICD: dominio intracelular (del inglés: *IntraCellular Domain*).

ICS: solución intracelular (del inglés, *IntraCellular Solution*).

KT-5720: (9R,10S,12S)-2,3,9,10,11,12-Hexahidro-10-hidroxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocina -10-ácido carboxílico, éster hexílico.

LGIC: canales iónicos activados por ligando (del inglés: *Ligand-Gated Ion Channel*).

M1: segmento transmembrana 1.

M2: segmento transmembrana 2.

M3: segmento transmembrana 3.

M4: segmento transmembrana 4.

mAChR: receptor muscarínico de acetilcolina (del inglés: *Muscarinic Acetylcholine Receptor*).

MERS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (del inglés: *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*).

MLA: metillicaconitina.

MPT: modificación postraducciona.

ms: milisegundo.

MuSK: receptor MuSK (del inglés: *Muscle-Specific Kinase*).

NA: noradrenalina.

NACHO: chaperona NACHO o TMEM35 (del inglés: *Transmembrane Protein 35*).

nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina (del inglés: *Nicotinic Acetylcholine Receptor*).

NAM: modulador alostérico negativo (del inglés: *Negative Allosteric Modulator*).

NMJ: unión neuromuscular (del inglés: *Neuromuscular Junction*).

nP_o: probabilidad de apertura.

ns: no significativo.

NT: neurotransmisor.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORF: marco de lectura abierto (del inglés: *Open Reading Frame*).

PAM: modulador alostérico positivo (del inglés: *Positive Allosteric Modulator*).

PBS: buffer fosfato salino (del inglés: *Phosphate Buffered Saline*).

PCR: técnica de reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*).

p-ERK 1/2: quinasa ERK 1/2 fosforilada (del inglés: *Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2*).

PKA: proteína quinasa A dependiente de AMPc (del inglés: *cAMP-Dependent Protein Kinase*).

PKC: proteína quinasa C (del inglés: *Protein Kinase C*).

pLGIC: canal iónico pentamérico activado por ligando (del inglés: *Pentameric Ligand-Gated Ion Channel*).

PMA: forbol-12-miristato-13-acetato (del inglés: *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*).

PNU-120596: N-(5-cloro-2,4-dimetoxifenil)-N'-(5-metil-3-isoxazolil)-urea.

PNU-282987: N-[(3'R)-1'-azabicyclo[2.2.2]oct-3'-il]-4-clorobenzamida.

PP2: 4-amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil)pirazolo[3,4-d]pirimidina.

PPM: proteína fosfatasa metalodependiente (del inglés: *Metallo-Dependent Protein Phosphatase*).

PPP: fosfoproteína fosfatasa (del inglés: *Phosphoprotein Phosphatase*).

Proteína S: proteína espiga (del inglés: *Spike Protein*).

PTK: proteína tirosina quinasa (del inglés: *Tyrosine Protein Kinase*).

PTP: proteína tirosina fosfatasa (del inglés: *Protein Tyrosine Phosphatase*).

RBD: dominio de unión al receptor (del inglés: *Receptor Binding Domain*).

RBM: motivo de unión al receptor (del inglés: *Receptor Binding Motif*).

Ric-3: chaperona Ric-3 (del inglés: *Resistant to Inhibitors of Cholinesterase 3*).

SAM: modulador alostérico silente (del inglés: *Silent Allosteric Modulator*).

SARS-CoV: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (del inglés: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*).

SARS-CoV-2: coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (del inglés: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*).

SD: desviación estándar (del inglés: *Standard Deviation*).

Ser: serina (del inglés: *Serine*).

SFK: quinasa de la familia Src (del inglés: *Src Family Kinase*).

SN: sistema nervioso.

SNC: sistema nervioso central.

SNP: sistema nervioso periférico.

Src: protooncogén tirosina-proteína quinasa Src (del inglés: *Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase Src*).

SU6656: (3Z)-N,N-Dimetil-2-oxo-3-(4,5,6,7-tetrahidro-1H-indol-2-ilmetilideno)-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfonamida.

THC: trans- Δ^9 -tetrahidrocannabinol.

Thr: treonina (del inglés: *Threonine*).

TMD: dominio transmembrana (del inglés: *TransMembrane Domain*).

TMPRSS2: serina proteasa celular de transmembrana 2 (del inglés: *Transmembrane Serine Protease 2*).

TQS: 4-naftalen-1-il-3a,4,5,9b-tetrahidro-3H-ciclopenta[c]quinoline-8-sulfónico amida.

Tyr: tirosina (del inglés: *Tyrosine*).

ZAC: receptores activados por zinc (del inglés: *Zinc-Activated Ion Channel*).

α -BTX: α -bungarotoxina.

PUBLICACIONES

1. Trabajos publicados en revistas científicas

1. **Chrestia JF**, Bruzzone A, Esandi MC and Bouzat C (2021). Tyrosine phosphorylation differentially fine-tunes ionotropic and metabotropic responses of human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78, 5381–5395. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03853-3>
2. **Chrestia JF**, Oliveira AS, Mulholland AJ, Gallagher T, Bermúdez I, and Bouzat C (2022). A Functional Interaction Between Y674-R685 Region of the SARS-CoV-2 Spike Protein and the Human $\alpha 7$ Nicotinic Receptor. *Molecular neurobiology*, 59(10), 6076–6090. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02947-8F>
3. **Chrestia JF**, Esandi MC and Bouzat C (2022). Cannabidiol as a modulator of $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Cellular and molecular life sciences* 79(11), 564. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04600-y>
4. **Chrestia JF**, Turani O, Rodriguez Araujo N, Hernando G, Esandi MC and Bouzat C (2023). Regulation of nicotinic acetylcholine receptors by post-translational modifications. *Pharmacol Res.* 2023;190:106712. doi:10.1016/j.phrs.2023.106712

2. Capítulos de libros

1. Cecilia Bouzat and **Juan Facundo Chrestia** (2023). Acetylcholine Receptor. *Textbook of Ion Channels Volume II*. Editors: Jie Zheng and Matt Trudeau. Volume: II. Chapter: 15. Aceptado para su publicación impresa el 28/06/2023.