



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DOCTOR EN BIOQUÍMICA

**“Caracterización de la interacción entre el anticonvulsivo
Lamotrigina y el Receptor de Acetilcolina Nicotínico”**

ANA SOFÍA VALLÉS

Bahía Blanca

Argentina

2008



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

**TESIS
DOCTOR EN BIOQUIMICA**

**“Caracterización de la interacción entre el anticonvulsivo
Lamotrigina y el receptor de acetilcolina nicotínico”.**

Ana Sofía Vallés

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2008

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Francisco José Barrantes

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 Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) durante el período comprendido entre el 28 de Septiembre del 2004 y el 28 de Noviembre del 2008, bajo la dirección del Doctor Barrantes, Francisco José; Profesor principal de la Cátedra de Química Biológica I.

Ana Sofía Vallés



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota.

María Teresa de Calcuta

A mis padres, Anahí y Enrique.

AGRADECIMIENTOS

- ✚ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) le agradezco el apoyo económico brindado para la concreción de este trabajo de Tesis de doctorado. A la Universidad Nacional del Sur, al INIBIBB y al Dr. Barrantes por haberme permitido desarrollar las tareas de investigación presentadas en esta Tesis.
- ✚ Al Centro de Medicina Nuclear de Bahía Blanca y al Laboratorio IACA de Bahía Blanca por realizar sin cargo, las determinaciones de los niveles de radioactividad de las distintas muestras de esta Tesis.
- ✚ A mis compañeros del INIBIBB y de Química Biológica I, por compartir conmigo su amistad y por todo el apoyo que me han dado durante estos años.
- ✚ A mis padres, Anahí y Enrique, por brindarme su amor y contención. Por darme la oportunidad de cumplir mi vocación. Por sus consejos. Por estar siempre a mi lado.
- ✚ A mis hermanos, María Clara y Esteban, por acompañarme siempre.
- ✚ A mis suegros, Elsa y Juan, por el afecto y buen humor que me dan todos los días.
- ✚ A mi esposo Ignacio, por su amor incondicional, por sus consejos y paciencia, por estar siempre a mi lado, por ser mi compañero en la vida.

28 de Noviembre de 2008

Ana Sofía Vallés

Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR.

Resumen

El objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar si la droga anticonvulsiva Lamotrigina (6-(2,3-diclorofenil) 1,2,4-triazina-3, 5-diamina) interacciona con el AChR. Tal objetivo se asienta en el hecho que tanto el epifenómeno de la activación del AChR (luego de la unión con su ligando) es la permeación del Na⁺, al igual que el blanco farmacológico de la Lamotrigina (LTG), explotado en terapéutica.

En una primera etapa, estudiamos mediante la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* si la LTG interacciona de forma directa con el AChR muscular. Elegimos este subtipo de AChR por ser el mejor caracterizado y por ser el prototipo de la familia de receptores nicotínicos. Efectivamente, al exponer las células CHO-K1/A5, que expresan AChR muscular adulto (Roccamo et al., 1999) a la droga LTG (50-400 μM), pudimos comprobar que la LTG interacciona con los AChRs, ejerciendo un efecto bloqueador de canal abierto cuando es co-aplicada con el agonista natural ACh (1 μM). Dicho efecto es proporcional a la concentración de LTG aplicada.

En una segunda etapa, analizamos si la LTG ejercía efectos a nivel celular, específicamente si la droga afectaba la morfología y/o la supervivencia celular. Al comparar las células CHO-K1/A5 incubadas en presencia de LTG con respecto a las células control, en ausencia de la droga, comprobamos que no se afecta la morfología celular en presencia del anticonvulsivo. Mediante la técnica de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol, que permite estudiar cambios en la viabilidad celular, observamos que la presencia de LTG protegía a las células CHO-K1/A5 de la muerte celular frente a un estímulo nocivo, como es la ausencia de suero en los medios de cultivo. En cambio, las células parentales CHO-K1, que carecen de AChR, no se benefician de tal protección. Estos resultados sugieren que la droga LTG ejerce algún otro tipo de efecto sobre los AChRs. Un simple bloqueador de canal abierto no podría ejercer este efecto en ausencia de agonista que mediara la apertura previa del canal.

En el segundo Capítulo de esta Tesis, nuevamente recurrimos a técnicas electrofisiológicas para describir que en ausencia de agonista alguno, la LTG produce la activación del canal iónico. Estos resultados se complementan con estudios farmacológicos realizados por medio de la técnica de ligazón de I¹²⁵ unido a la α -bungarotoxina (α -BTX), antagonista cuasi-irreversible del AChR, y estudios adicionales de microscopía de fluorescencia y fluorescencia en cubeta.

El Capítulo 3 de esta Tesis tuvo como objetivo la obtención de un sistema celular de mamífero que expresase en forma estable a los $\alpha 7$ AChRs neuronales funcionalmente intactos en su superficie, con miras a futuros estudios farmacológicos sobre receptores del SNC. Obviamente, el requisito indispensable para tal fin es contar con expresión estable del $\alpha 7$ AChR. En el laboratorio se intentaron varias estrategias para intentar aumentar el nivel de expresión en membrana celular del $\alpha 7$ AChR (re-transfección de células en forma transiente con la subunidad $\alpha 7$, inducción del aumento de expresión con nicotina o con incubaciones a 25°C) (Schroeder et al., 2003) en células SHE-P1-h $\alpha 7$. Dichas células expresan en forma estable al AChR neuronal $\alpha 7$ (Peng et al., 1999), y aunque si bien unen α -BTX, su nivel de expresión en membrana es excesivamente bajo para su detección por técnicas de microscopía de fluorescencia o por técnicas electrofisiológicas de canal único. Es por ello que se recurrió a la tranfección de dichas células con la proteína Ric-3. Esta proteína, descubierta inicialmente en *Caenorhabditis elegans* (Williams et al., 2005), es requerida para la maduración de los AChRs en células que expresan endógenamente al AChR. Además se ha informado que la proteína Ric-3 homóloga humana aumenta la expresión de los $\alpha 7$ AChR en ovocitos de *Xenopus laevis* (Castillo et al., 2005). Efectivamente, a las 48 hs de tranfectar las células con el ADNc de la proteína Ric-3 pudimos observar por técnicas citoquímicas la expresión del $\alpha 7$ AChR en la superficie de las células SHE-P1-h $\alpha 7$. Dado el carácter transiente de dicha expresión, se obtuvo subsecuentemente una línea celular que expresa al $\alpha 7$ AChR neuronal en forma permanente, obteniéndose un clon denominado SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric3. Con esta nueva

herramienta celular realizamos estudios farmacológicos y electrofisiológicos para caracterizarla. En el futuro se piensa estudiar posibles interacciones de LTG con el $\alpha 7$ AChR en esta línea celular.

Abstract

In this Thesis, we investigated if the anticonvulsive drug Lamotrigine (6-(2,3-dichlorophenyl) 1,2,4-triazine-3,5-diamine) interacted with the nicotinic acetylcholine receptor (AChR). Since the most common pharmacological target of Lamotrigine (LTG) is the voltage-gated Na⁺ channel, we investigated if this drug interacted with the AChR, based on the premise that the epiphenomenon of AChR activation is the permeation of sodium ions, as is that of LTG, exploited in therapeutic intervention.

We begun by studying whether exposure to LTG (1-400 μ M) modified kinetic parameters of the AChR. We chose to perform our experiments on the muscle AChR subtype because it is the best characterized prototype channel of the Ligand-gated ion channel (LGIC) superfamily. Indeed, when CHO-K1/A5 cells heterologously expressing adult muscle-type AChR (Roccamo et al., 1999) were exposed to LTG (50-400 μ M) and studied with the electrophysiological patch-clamp technique, we demonstrated that LTG interacted with AChRs and exerted a channel blocking effect when co-applied with ACh (1 μ M) in a concentration-dependent manner.

In a subsequent series of experiments, we studied whether LTG caused any effect at the cellular level, more specifically, on cell morphology and/or cell survival. LTG produced no alterations of morphological parameters with respect to cells incubated in the absence of LTG. We subsequently resorted to the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay to assess whether LTG affected cell survival upon submission of cells to a serum deprivation stress. CHO-K1/A5 cells were protected from cell death only after being incubated with LTG. This protection did not occur in CHO-K1 cells, devoid of AChRs. These results lead us to conclude that the anticonvulsive drug LTG displays other forms of interaction with the AChR. A simple channel blocker would not exert such an effect in the absence of a previous agonist-mediated channel opening.

The second Chapter of this Thesis also employs electrophysiological techniques to describe the direct activation of the AChR channel by LTG in the absence of an agonist. Such an effect is further supported by a combination of pharmacological radioligand binding studies using [¹²⁵I]- α -bungarotoxin (α -BTX[¹²⁵I]), fluorescence spectroscopy, and fluorescence microscopy.

The third Chapter of this Thesis focuses on the study of the α 7 neuronal type of AChR. Our main objective was the obtention of a mammalian cell line expressing in a functional manner α 7 AChRs at the cell membrane. Several techniques were attempted in the laboratory (re-transfection of the α 7 subunit, incubation of the cells for 48 h in the presence of nicotine, incubation of the cells at 25°C) in order to enhance the number of α 7 AChR at the cell surface of SHE-P1-h α 7 (Peng et al., 1999). Although SHE-P1-h α 7 cells express the α 7 AChR in a stable manner, the level of expression is so low at the cell surface that it can not be detected by fluorescence microscopy or electrophysiological techniques at the single-channel level.

For this reason we decided to transfect the SHE-P1-h α 7 cells with the Ric-3 protein. Previous reports argued in favor of the Ric-3 protein as a necessary factor to produce levels of α 7 AChR detectable at the cell surface. Ric-3 protein was first discovered in *Caenorhabditis elegans* and is present in cells that endogenously express α 7 AChR (Williams et al., 2005). Ric-3 has proved to increase α 7 AChRs in oocytes from *Xenopus laevis* (Castillo et al., 2005). As expected, 48 h after transfection with the cDNA coding for the Ric-3 protein, α 7 AChR expression at the cell membrane increased. Upon selection of positive clones a cell line was obtained that expressed both α 7 AChR and the Ric-3 protein in a stable manner; the new cell line was coined SHE-P1-h α 7-Ric-3.

With this new cellular tool we undertook the characterization of the functional properties of α 7 AChR expressed in the mammalian cell line SHE-P1-h α 7-Ric3, performing pharmacological and electrophysiological studies. In the near future we plan to study

possible interactions between LTG and the neuronal $\alpha 7$ AChR in the SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3 cell line.

Índice

RESUMEN	I
ABSTRACT.....	IV
ÍNDICE	1
ABREVIATURAS.....	4
INTRODUCCIÓN	7
1) SISTEMA NERVIOSO.....	8
1.1) <i>Sinapsis eléctrica</i>	8
1.2) <i>Sinapsis química</i>	9
2) LOS RECEPTORES	12
2.1) <i>El neurotransmisor acetilcolina</i>	13
2.2) <i>Múltiples receptores pueden ser activados por un mismo neurotransmisor</i>	14
2.3) <i>Canales iónicos activados por ligando (LGICs)</i>	15
2.4) <i>La familia de receptores del lazo de cisteína</i>	16
2.5) <i>Estructura y distribución de los AChRs</i>	17
2.6) <i>Topología de las subunidades del AChR</i>	17
2.7) <i>DNT</i>	19
2.8) <i>El sitio de unión de agonistas del AChR</i>	19
2.9) <i>Estructura del canal iónico</i>	21
2.10) <i>Conductancia iónica y filtro de selectividad</i>	22
2.11) <i>La compuerta</i>	23
2.12) <i>Mecanismo de activación del AChR</i>	23
2.13) <i>Aspectos generales de la función del AChR</i>	24
2.14) <i>Modulación de los receptores de la familia Cys-loop</i>	27
2.15) <i>Agonistas</i>	27
2.16) <i>Bloqueo del canal</i>	28
2.17) <i>Inhibición alostérica</i>	28
2.18) <i>Desensibilización</i>	29
3) <i>¿POR QUÉ SE ESTUDIA EL ACHR?</i>	29
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1) EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ACh EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES	32
<i>Líneas celulares utilizadas y generadas</i>	32
2) REGISTROS DE <i>PATCH-CLAMP</i>	34
2.1) <i>Registros en la configuración "célula adherida" (cell-attached)</i>	35
2.2) <i>Registros en la configuración "célula entera" (whole-cell)</i>	40
3) MEDICIÓN DE UNIÓN DE LIGANDOS	41
3.1) <i>Derivatización y separación de α-BTX [125I]</i>	41
3.2) <i>Determinación de la unión de α-BTX [125I] a células enteras.</i>	42
3.3) <i>Ligazón de α-BTX unida a sonda fluorescente</i>	44
4) MEDICIÓN DE SUPERVIVENCIA CELULAR.....	46
5) PREPARACIÓN DE MEMBRANAS CRUDAS Y RICAS EN ACHR DE <i>T. CALIFORNICA</i>	46
5.1) <i>Medición de fluorescencia de la sonda cristal violeta</i>	46
5.2) <i>Tratamiento analítico de los registros de fluorescencia</i>	47
6) CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	47
7) ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48

CAPÍTULO 1	49
“BLOQUEO DEL RECEPTOR NICOTÍNICO MUSCULAR POR EL ANTICONVULSIVO LAMOTRIGINA”	49
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	50
RESULTADOS:	51
1) <i>Caracterización de la activación de los AChRs</i>	51
2) <i>Caracterización de la acción de Lamotrigina sobre el AChR</i>	54
2.1) <i>Caracterización a nivel de canal único del bloqueo de los AChRs por Lamotrigina.</i>	57
2.1.1) <i>Efecto de la Lamotrigina sobre el tiempo de estado abierto del receptor.</i>	57
2.1.2) <i>Efecto de la Lamotrigina sobre el tiempo de estado cerrado del receptor</i>	58
2.1.3) <i>Efecto de la Lamotrigina sobre el tiempo de estallido del receptor</i>	60
2.1.4) <i>Efecto de la Lamotrigina sobre la amplitud de las corrientes del AChR.</i>	62
3) <i>Estudio de la viabilidad de las células tratadas con LTG</i>	63
DISCUSIÓN	66
CAPÍTULO 2	72
“ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO MUSCULAR POR EL ANTICONVULSIVO LAMOTRIGINA”	72
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	73
RESULTADOS	73
1) <i>Caracterización de la acción de la LTG sobre el AChR</i>	73
1.1) <i>Caracterización de la activación de los AChRs por LTG</i>	74
1.1.1) <i>Caracterización del tiempo de estado abierto de los AChRs activados por LTG.</i>	74
1.1.2) <i>Caracterización de los tiempos de estado cerrado de los AChRs activados por LTG</i>	75
1.1.3) <i>Caracterización de los tiempos de estallido de los AChRs activados por LTG</i>	77
1.2) <i>Parámetros cinéticos del AChR activado por LTG</i>	78
2) <i>Corrientes macroscópicas del AChR</i>	80
3) <i>Efectos de la LTG sobre la unión de la α-BTX a células CHO-K1/A5 vivas.</i>	81
4) <i>LTG no inhibe la unión del antagonista α-BTX al AChR</i>	83
5) <i>Bloqueo del AChR por Lamotrigina.</i>	84
5.1) <i>Análisis de los parámetros cinéticos del AChR bloqueado por LTG</i>	85
6) <i>Efecto de la LTG sobre canales activados a altas concentraciones de ACh</i>	87
ANEXO 1	91
<i>La LTG induce transiciones entre los estados de reposo y desensibilizados de los AChRs de Torpedo</i>	91
DISCUSIÓN	96
CAPÍTULO 3	103
“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO NEURONAL α7 EN LA SUPERFICIE CELULAR DE CÉLULAS α7-ACHR-RIC-3”	103
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	104
RESULTADOS	108
1) <i>Detección del α7 AChR en células SHE-P1-hα7.</i>	108
2) <i>Expresión de la proteína α7 AChR</i>	109
3) <i>Expresión de la proteína Ric-3 humana en la línea celular SHE-P1-hα7.</i>	111
4) <i>Caracterización de la expresión del α7 AChR en la línea celular SHE-P1-hα7-Ric-3.</i>	113
5) <i>Asociación del antagonista α-BTX al α7 AChR expresado en células SHE-P1-hα7-Ric-3.</i>	116
6) <i>Disociación del antagonista α-BTX al α7 AChR expresado en células SHE-P1-hα7-Ric-3</i>	117
7) <i>Distribución de los receptores nicotínicos α7 en células SHE-P1-hα7 y en las SHE-P1-hα7-Ric-3</i>	118
8) <i>Interacción de la nicotina con el α7 AChR expresado en células SHE-P1-hα7-Ric-3</i>	119
9) <i>Estudio de la cinética del α7 AChR expresado en células SHE-P1-hα7-Ric-3.</i>	119

10) Caracterización del tiempo de estado abierto del receptor	121
11) Caracterización del tiempo de estado cerrado del receptor	122
12) Caracterización del tiempo de estallido del receptor	122
13) Caracterización de la amplitud de las corrientes del receptor	123
14) Variación de los parámetros cinéticos del $\alpha 7$ AChR en función del potencial de membrana aplicado	124
DISCUSIÓN	128
CONCLUSIONES FINALES.....	133
BIBLIOGRAFÍA	135
PUBLICACIONES	149

ABREVIATURAS

A = agonista.

α BTX = α -bungarotoxina.

α BTX[I¹²⁵] = α -bungarotoxina-I¹²⁵.

ACh = acetilcolina.

AChR = receptor de acetilcolina nicotínico.

ADN = ácido desoxirribonucleico.

ADNc = ácido desoxirribonucleico complementario.

AMPA = ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxanolpropiónico.

APL = "allosterical potentiating ligands".

ARNm = ácido ribonucleico mensajero.

B = bloqueador.

Carb = carbamilcolina.

CM = medio completo.

C-terminal = carboxilo-terminal.

CrV = sonda fluorescente Cristal violeta.

D = estado desensibilizado del AChR.

D.E.= desvío estandar.

DMEN = "Dulbecco Modified Eagle Medium".

ECS = solución extracelular.

fisost =fisostigmina.

°C = grados centígrados.

G Ω = gigaohm.

gal = galantamina.

Gal-T = β -1,4-galactosiltransferasa.

GABA_AR = receptor de ácido- γ -aminobutírico tipo A.

GFP = proteína fluorescente verde.

HEK = "human embryonic kidney".

hs = hora/s.

IC₅₀ = concentración que inhibe el 50% de la respuesta.

ICS = solución intracelular.

INC = inhibidores no competitivos.

K_D = constante de disociación.

LGIC = canales iónicos activados por ligandos.

LTG = lamotrigina.

M = molar.

M1= segmento transmembranal M1.

M2= segmento transmembranal M2.

M3= segmento transmembranal M3.

M4= segmento transmembranal M4.

min = minutos.

mM = milimolar.

mm = milímetros.

ms = milisegundos.

mV = milivoltio.

nM = nanomolar.

MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol.

MPP⁺ = 1-metil-4-fenilpiridinio.

NMDA = N-metil-D-aspartato.

Nic = nicotina.

N-terminal = amino terminal.

pA = picoamperes.

PCR = reacción de la polimerasa en cadena.

pH = -log [H⁺].

R = estado de reposo del AChR, susceptible de ser activado.

R* = estado activado del AChR.

ROS = especies oxígeno reactivas.

s = segundo/s.

SFM = medio libre de suero.

SNC = sistema nervioso central.

SNP = sistema nervioso periférico.

T.californica = *Torpedo californica*.

μm = micrómetro.

μM = micromolar.

μl = microlitros.

μs = microsegundo.

τ_{open} = tiempo de estado abierto del canal.

τ_{burst} = tiempo de estallido del canal.

τ_{cerrado} = tiempo de estado cerrado del canal.

Introducción

1) Sistema nervioso

Una de las funciones fundamentales del sistema nervioso es la transmisión de información. Las células del sistema nervioso envían señales de unas a otras y a células no neuronales como las musculares o glandulares a través de uniones especializadas denominadas sinapsis (del griego *sin-*, que significa "juntos", y *haptaina*, que significa "con firmeza"). Existen sinapsis eléctricas o químicas según la modalidad de transmisión del impulso nervioso.

1.1) Sinapsis eléctrica

En las sinapsis eléctricas (Figura 1) la transmisión de información entre neuronas se produce después de que estas células se acoplan eléctricamente entre sí a través de complejos proteicos denominados uniones estrechas. En la sinapsis eléctrica la transmisión entre la primera neurona y la segunda no se produce por la secreción de un neurotransmisor, como en las sinapsis químicas, sino por el paso de iones de una célula a otra, a través de uniones estrechas. Estas son pequeños canales formados por el acoplamiento de complejos proteicos, basados en conexinas, en células estrechamente adheridas. Las sinapsis eléctricas son por tanto más simples, y por ende, más rápidas que las sinapsis químicas. En vertebrados son abundantes en la retina y en la corteza cerebral.

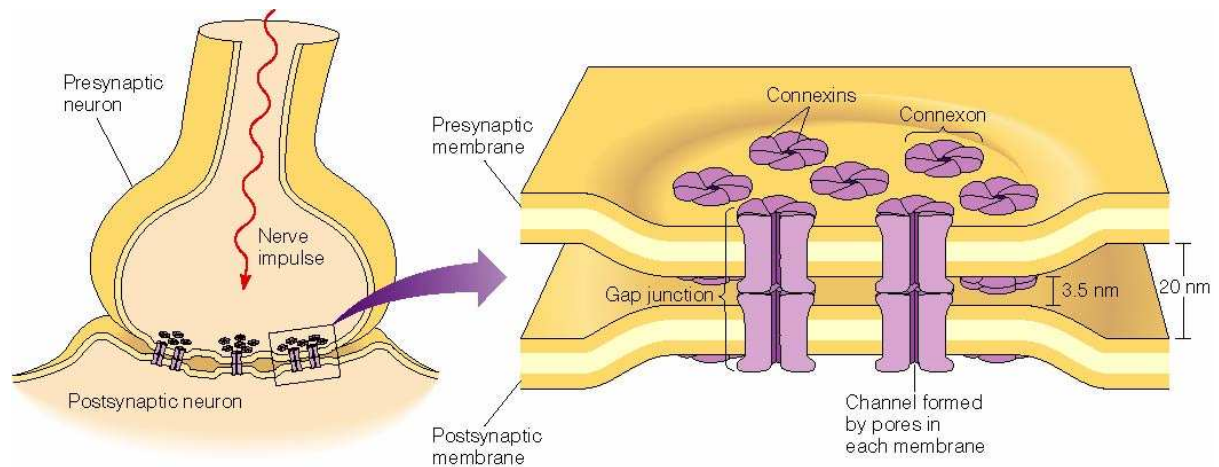


Figura 1.

Representación esquemática de una sinapsis eléctrica (Tomado de la página <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-13/CB13.html>)

1.2) Sinapsis química

En la sinapsis química la transmisión de información se inicia tras la liberación de moléculas señalizadoras denominadas neurotransmisores tras la llegada de un impulso nervioso (o potencial de acción), y se produce mediante un proceso muy rápido de secreción celular en el terminal nervioso presináptico (Figura 2). Al llegar el impulso nervioso al terminal, se produce la apertura de canales de calcio sensibles a voltaje. De esto resulta un rápido aumento del calcio intracelular que activa la liberación del neurotransmisor contenido en las vesículas sinápticas. De tal modo, el terminal presináptico produce exocitosis del neurotransmisor hacia la hendidura sináptica. Esta molécula señalizadora difunde tras un periodo de retraso de unos 0,5 ms y se une a sus receptores específicos -contenidos en la membrana postsináptica de la célula blanco- del lado opuesto de la hendidura, resultando de ello la apertura de los canales iónicos cercanos de esta membrana. De esta manera los iones fluyen hacia o desde el interior, cambiando el potencial de membrana local. El resultado es excitatorio en caso de flujos de despolarización (se produce un incremento en la permeabilidad del Na^+) lo que provoca que el impulso nervioso se propague nuevamente a través de una segunda neurona o ponga en acción un órgano efector. El efecto es inhibitorio en caso de flujos de hiperpolarización. El que una sinapsis sea excitatoria o inhibitoria depende entonces del tipo o tipos de iones que permean el canal en los flujos

postsinápticos, que a su vez es función del tipo de receptores y neurotransmisores que intervienen en la sinapsis.

Numerosas moléculas pueden actuar como neurotransmisores:

- Monoaminas o aminas biógenas (Ej. catecolaminas, indolaminas, tironaminas, tiramina, β -feniletilamina, octopamina, histamina)

- Ésteres (Ej. acetilcolina)

- Aminoácidos (Ej. ácido gama-aminobutírico, glicina, taurina, ácido glutámico, ácido aspártico)

- Purinas (Ej. adenosina, ATP, GTP)

- Prostaglandinas (prostaglandina E y F)

- Neuropéptidos (Ej. angiotensina II, bombesina, neurotensina, calcitonina, vasopresina, etc.)

La zona de la sinapsis donde se libera el neurotransmisor se denomina zona activa. En las zonas activas, las membranas de las dos células adyacentes están unidas estrechamente mediante proteínas de adhesión celular. Tras la membrana de la célula postsináptica aparece un complejo de proteínas entrelazadas denominado densidad postsináptica.

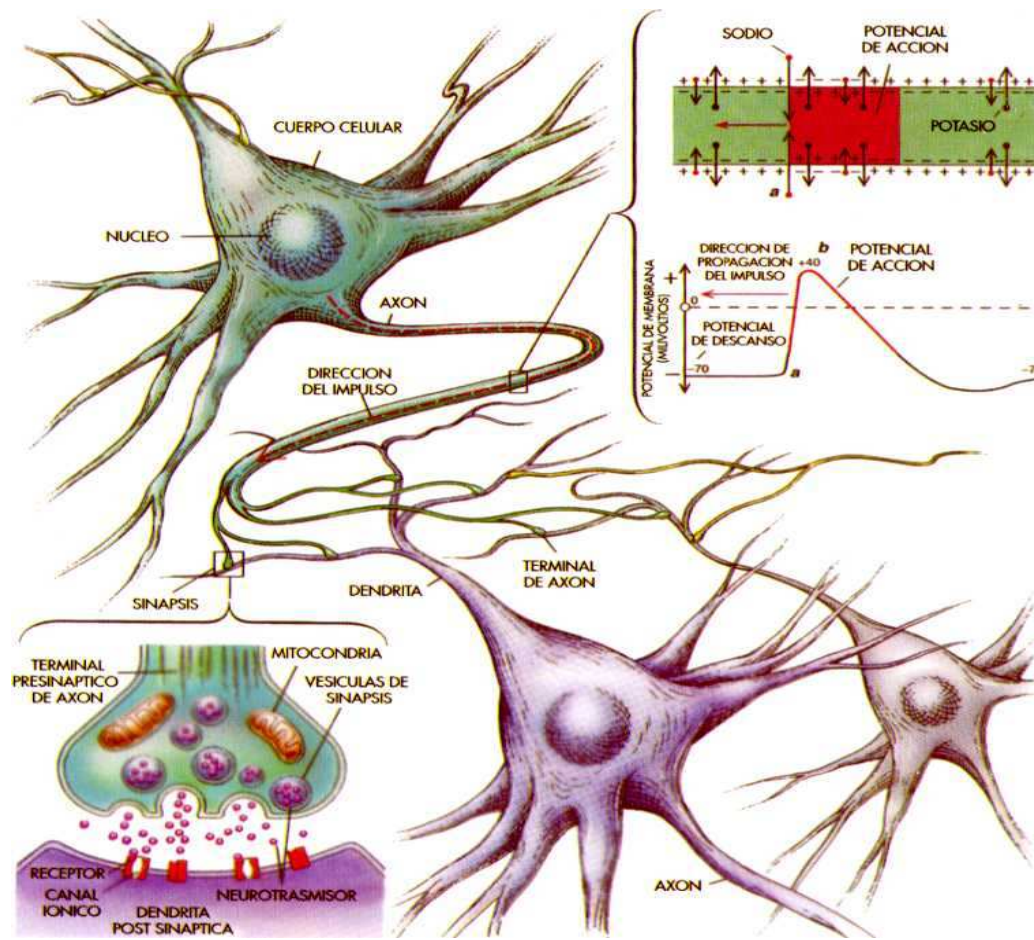


Figura 2.

Representación esquemática de una sinapsis química. (Tomado de [www. carampangue.cl](http://www.carampangue.cl)).

Las proteínas de la densidad postsináptica cumplen numerosas funciones, que van desde el anclaje y movimiento de receptores de la membrana plasmática, al anclaje de varias proteínas reguladoras de la actividad de estos receptores. La más estudiada de las sinapsis químicas es la unión neuromuscular. Esta se produce entre una neurona motora y una célula muscular, posibilitando la contracción muscular. El fenómeno de transmisión finaliza cuando el neurotransmisor difunde, es recaptado o hidrolizado.

2) Los receptores

Los receptores son proteínas presentes en la membrana plasmática, en la membrana de las organelas o en el citosol celular, a las que se unen específicamente otras sustancias químicas llamadas moléculas señalizadoras, como las hormonas y los neurotransmisores.

El reconocimiento de la estructura química de una molécula señalizadora por el receptor específico utiliza mecanismos de enlace no covalente como los puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, fuerzas hidrófobas y de Van der Waals. La equivalencia entre la unión molécula señalizadora-receptor y la molécula señalizadora libre es igual a: $[H] + [R] \leftrightarrow [HR]$, con

$$K_d = \frac{[H] * [R]}{[HR]}$$

[R]=receptor; [H]= molécula señalizadora libre; [HR]=receptor unido a la molécula señalizadora

Lo importante de la fuerza de la señal transmitida por el receptor es la concentración de complejos molécula señalizadora -receptor, que es definida por la afinidad que existe entre el neurotransmisor con su receptor, por la concentración de la molécula señalizadora y por la concentración del receptor. La concentración de molécula señalizadora circulante es el punto principal de la fuerza de la señal, siempre que los otros dos valores sean constantes. A su vez, la célula puede modificar la sensibilidad del receptor, por ejemplo, mediante modificaciones químicas covalentes (p.ej. fosforilación). Cambios en el número de receptores presentes en la membrana -resultante este parámetro del equilibrio entre biosíntesis, endocitosis y reciclado- pueden también modificar la fuerza total de señalización en el interior de la célula.

La unión de una molécula señalizadora a sus receptores específicos desencadena una cascada de reacciones en el interior celular (transducción de señal), cuyo resultado final depende tanto del estímulo recibido como también de otros factores, como el estadio celular, el estado metabólico de la célula, la presencia de patógenos, entre otros.

2.1) El neurotransmisor acetilcolina

En este trabajo de Tesis se utilizó como neurotransmisor a la **acetilcolina** (ACh). Esta molécula es un compuesto orgánico (un éster de ácido acético y colina con fórmula química $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), identificada por primera vez en 1914 por Henry Hallett Dale. Se trata del primer compuesto orgánico confirmado como neurotransmisor por Otto Loewi. La ACh está ampliamente distribuida en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso periférico. Su función, al igual que otros neurotransmisores, es mediar en la actividad sináptica del sistema nervioso. Mucho más recientemente se han descubierto acciones de este neurotransmisor en tejidos no neurales como la epidermis, el epitelio bronquial, el endotelio vascular, células del sistema inmunitario y otros (Kurzen et al., 2006; Egletton et al 2008; Cooke, 2007; Elgoyhen et al., 2001; Plazas et al., 2005) con implicancias en procesos inflamatorios, cáncer y otros importantes aspectos biomédicos que no son contemplados en esta Tesis doctoral.

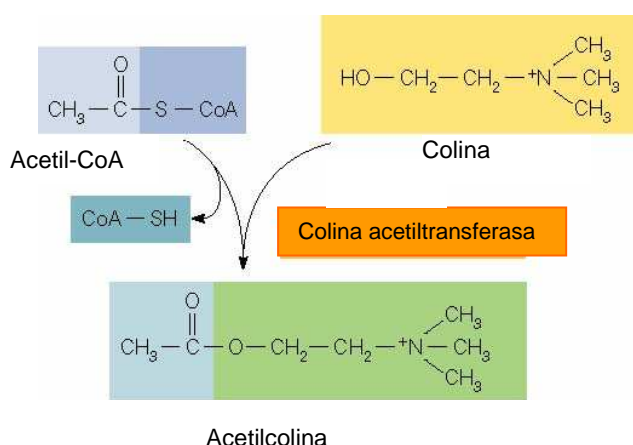


Figura 3.

Esquema que representa la síntesis de la ACh.

La ACh sintetizada en neuronas requiere de la acción de la enzima colina acetiltransferasa, que actúa sobre los sustratos colina y acetil-CoA para producir la pequeña molécula señalizadora de 174 de peso molecular (Figura 3). Normalmente, la ACh se degrada rápidamente una vez cumplida su función mediante la enzima acetil colinesterasa, que transforma a la ACh en colina y acetato.

La inhibición irreversible de esta enzima, p.ej. por medio de compuestos organofosforados, provoca una estimulación continua de los músculos, glándulas y sistema nervioso central. Sin embargo, desde que se asoció la reducción de la ACh con la enfermedad de Alzheimer, se ha extendido el uso terapéutico de algunos fármacos como la galantamina y fisostigmina, que inhiben esta enzima, para el manejo de algunos síntomas asociados con esta patología.

2.2) Múltiples receptores pueden ser activados por un mismo neurotransmisor

Existen dos tipos distintos de receptores que responden frente a la presencia de ACh. Los **receptores nicotínicos** y los receptores de tipo **muscarínico**. Los primeros se denominan nicotínicos porque pueden ser activados por la nicotina, a diferencia de los receptores muscarínicos, que son activados también por la muscarina, un alcaloide fúngico (Ishii et al., 2006). Los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico (AChR) pertenecen a la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando ("LGIC"). Estos se componen de heterooligómeros de cinco subunidades, cada uno con cuatro dominios transmembrana (Le Novère y Changeux, 1995). Tanto desde el punto de vista evolutivo y estructural los receptores de tipo muscarínico son completamente diferentes a los nicotínicos, perteneciendo a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G; éstas son proteínas integrales monoméricas que presentan siete dominios transmembrana, que en su cara citoplásmica interactúan con proteínas G heterotriméricas específicas para cada subtipo. En este trabajo de Tesis se estudiaron los *receptores de acetilcolina nicotínicos*.

2.3) Canales iónicos activados por ligando (LGICs)

Los LGIC son receptores del tipo ionotrópicos cuyo papel fisiológico es provocar la apertura de un canal iónico tras la unión de un neurotransmisor a su sitio de unión. El término LGICs incluye a tres grupos o superfamilias diferentes de proteínas que atraviesan la membrana plasmática. El primer grupo de receptores denominados de lazo de cisteína (“*Cys-loop*”, ver más abajo) incluyen a los AChRs, al receptor de serotonina, el receptor gabaérgico, el receptor de glicina y algunos receptores aniónicos de invertebrados. Todos los receptores del tipo de lazo de cisteína son pentámeros y están constituidos por subunidades homólogas. Se cree que los genes que codifican estas subunidades provienen de un gen ancestral común (Le Novère y Changeux, 1995).

Cada subunidad está formada por un dominio N-terminal seguido de tres segmentos transmembranales, un lazo o *loop* intracelular de tamaño variable que une a un cuarto segmento y finalmente un dominio C-terminal extracelular (Figura 4).

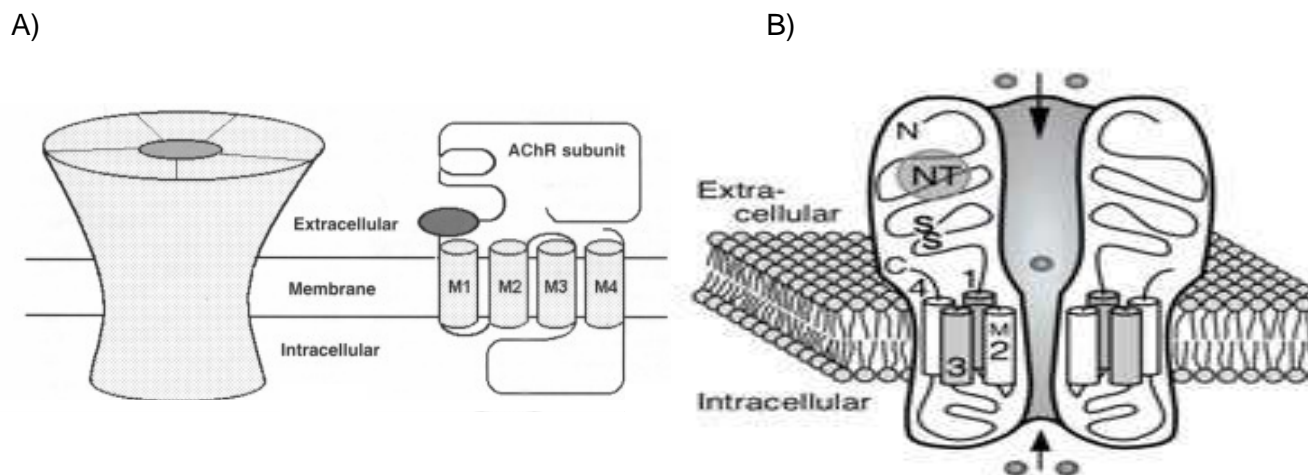


Figura 4.

Extraído y modificado de A) la página www.mgawk.org y de B) Figura 6 del trabajo “Pore conformations and gating mechanism of a Cys-loop receptor” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 1; 102(44):15877-82.

Un segundo grupo comprende a los receptores catiónicos activados por glutamato. A este grupo pertenecen los receptores del *N*-metil *D*-aspartato (NMDA-R), los receptores del α -

amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA-R) y los del kainato. Todos ellos son tetrámeros activados por el neurotransmisor endógeno glutamato.

Un tercer grupo de esta superfamilia comprende a los canales iónicos activados por ATP (receptores P2X), los cuales son canales catiónicos permeables a calcio y sodio y cuya apertura se produce tras la unión del ATP a su sitio.

2.4) La familia de receptores del lazo de cisteína

Este tipo de receptores se caracterizan por compartir un puente disulfuro entre dos cisteínas separadas por trece aminoácidos. Dentro de la superfamilia de LGICs se han identificados cinco familias de receptores del lazo de cisteína. Por un lado se encuentran los receptores que son conductores de cationes como el AChR, el receptor de serotonina tipo 3, y el canal activado por zinc (Huang et al., 1978; Dwyer et al., 1980; Yakel et al., 1990; Davies et al., 2003) y por otro lado los conductores de aniones; los receptores GABA tipo A y C y los receptores de glicina (Bormann et al., 1987; Fatima-Shad y Barry, 1993)(Figura 5).

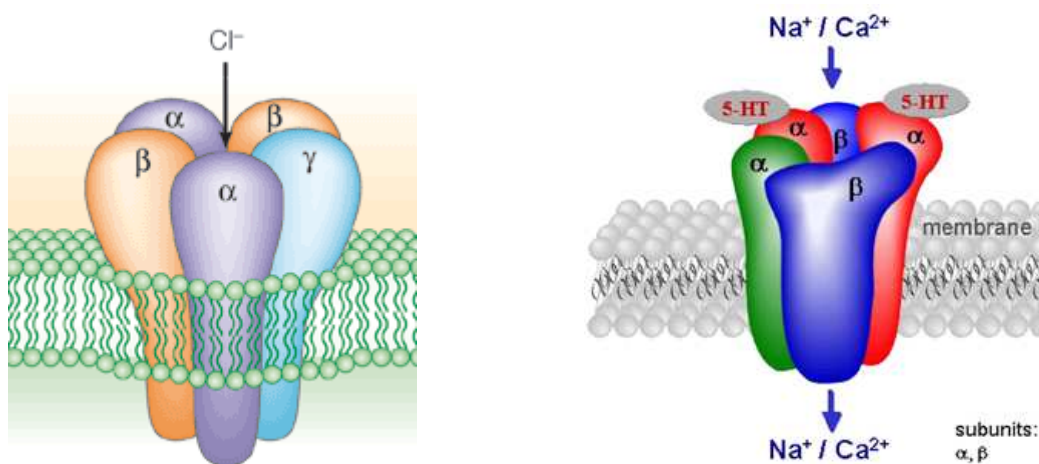


Figura 5.

Esquemas que representan a los receptores GABA_A (izquierda) y 5HT₃ (derecha). Los gráficos fueron extraídos y modificados de los trabajos "Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor", *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jul; 6(7):565-75, y "Antipsychotic drugs antagonize human serotonin type 3 receptor currents in a noncompetitive manner", *Mol Psychiatry.* 2004 Sep; 9(9):846-58, 818.

El AChR es el más estudiado de los receptores de la familia del lazo de cisteína y consecuentemente ha servido de modelo para el estudio de esta superfamilia de LGICs. Los receptores *Cys-loop* se ensamblan como pentámeros compuestos por cinco subunidades idénticas (homómeros) o diferentes (heterómeros) (Rafferty et al., 1980; Langosch et al., 1988; Nayeem et al., 1994).

2.5) Estructura y distribución de los AChRs

De acuerdo con su sitio de expresión los AChRs se pueden clasificar en musculares, neuronales o tisulares. Los receptores nicotínicos musculares son pentámeros formados tras el ensamblaje de las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, δ y ϵ en el músculo adulto de vertebrados y $\alpha 1$, $\beta 1$, δ y γ en el músculo fetal y en el órgano eléctrico de *Torpedo* (Noda et al., 1983). Estos receptores se encuentran en gran concentración en la unión neuromuscular donde se produce la transmisión de señales eléctricas en respuesta a la liberación de ACh desde la neurona presináptica para permitir entonces la contracción muscular. Por otra parte, los receptores nicotínicos neuronales están formados por la combinación de varias subunidades α_{2-6} y β_{2-4} (Boulter et al., 1986, 1987; Karlin, 2002) o también bajo la forma de homopentámeros, como es el caso de los receptores formados por cinco subunidades $\alpha 7$ (Karlin, 2002) y se encuentran ubicados mayoritariamente en el SNC. A su vez estos receptores exhiben una amplia gama de afinidades por la ACh, siendo alta para el $\alpha 4\beta 2$ y baja para el $\alpha 7$. Por último, entre los AChRs tisulares podemos mencionar a aquellos expresados en la cóclea, constituidos por las subunidades $\alpha 9$ (homoméricos) y $\alpha 9$ y $\alpha 10$ (heteromérico) con una estequiometría $(\alpha 9)_2(\alpha 10)_3$ (Elgoyhen et al., 2001; Plazas et al., 2005).

2.6) Topología de las subunidades del AChR

Las cinco subunidades que conforman al AChR muscular fueron nombradas de acuerdo con su orden de migración en geles de poliacrilamida, presentando la más alta movilidad la

subunidad α y la más baja la subunidad δ . Cada subunidad está formada por la unión de 500-600 aminoácidos que se pueden dividir en dos regiones. La primera de estas regiones está formada por los primeros 210 aminoácidos que conforman el dominio N-terminal hidrofílico extracelular, glicosilado, seguido por la otra región conformada por un dominio transmembranal compuesto por cuatro segmentos (hélices α) de aproximadamente 20 residuos (M1-M4), conectados entre sí por lazos extra e intracelulares, y finalmente un dominio C-terminal extracelular.

Tras el ensamblaje de cada una de estas dos regiones de las cinco subunidades del receptor, se forma el complejo pentamérico (Figura 4) que dará lugar a un canal de membrana. Éste estará compuesto por un dominio N-terminal (DNT) y por el dominio que forma las “paredes” del canal iónico (DCI). Los dominios transmembrana presentan una alta similitud de secuencia con otros miembros de esta superfamilia, particularmente, la alta conservación de secuencia de la subunidad M2 y su carácter anfipático sugiere una contribución dominante a la estructura del canal (Montal y Opella, 2002). Se cree que el poro del canal está formado por 5 segmentos M2 en α -hélice, aportado por cada una de las subunidades $[\alpha 2\beta(\epsilon/\gamma)\delta]$ (Blanton y Cohen, 1992, 1994; Unwin, 1993, 2003). La parte media del receptor está compuesta por dos grupos de anillos (Blanton y Cohen, 1992 y 1994), el anillo central compuesto por residuos polares no cargados y el anillo intermedio, cercano al amino terminal del segmento M2 (más proximal del citosol) y compuesto por residuos negativamente cargados (Figura 6).

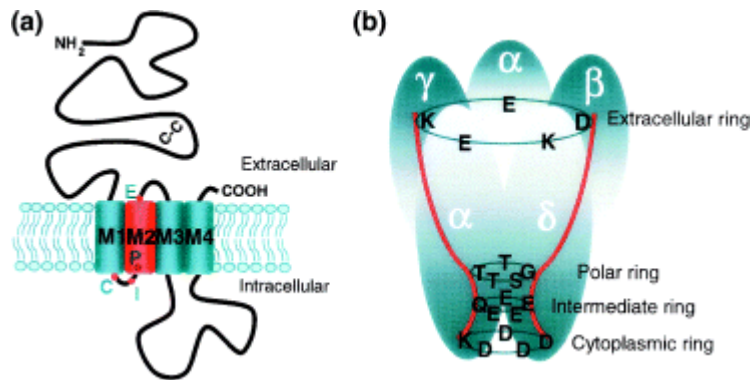


Figura 6.

(a) Estructura esquemática de una subunidad del LGIC en la que se muestra el gran dominio extracelular al cual se une el agonista, los cuatro dominios transmembrana y el lazo citoplásmico entre M3 y M4. Los anillos cargados están marcados así; C, anillo citoplásmico; I, anillo intermedio; p, anillo polar y E, anillo extracelular. (b) los aminoácidos implicados en los diferentes anillos cargados del AChR muscular. D, residuos aspartato negativamente cargados; E, residuos glutamato negativamente cargados; Q, residuos glutamina neutros; K, residuos lisina positivamente cargados, G, un residuo de glicina; T, un residuo de treonina polar y S, un residuo serina polar. El arreglo de las subunidades es $\alpha\gamma\beta\delta$.

2.7) DNT

El DNT está formado por 210 aminoácidos los cuales constituyen aproximadamente el 50% del total de la proteína. En esta porción de la proteína se encuentra el puente disulfuro (cys 128-cys 142) que precisamente ubica a estos receptores en la familia *Cys-loop* y que es de suma importancia para el correcto ensamblado y funcionamiento del canal (Green y Wanamaker, 1997; Green, 1998; Bouzat et al., 1994).

2.8) El sitio de unión de agonistas del AChR

El dominio de unión al ligando en el AChR muscular posee dos sitios para la ACh. Éstos se ubican en regiones diagonalmente opuestas del receptor, en las interfaces α - γ y α - δ (Blount y Merlie, 1989; Pedersen y Cohen, 1990). Las subunidades ubicadas en el dominio de unión al ligando están organizadas en dos grupos de láminas β , que a su vez se acumulan en una estructura sándwich β . Su unión es sustentada a través de puentes

disulfuros (Unwin, 2003). El dominio de unión al ligando está expuesto en la superficie extracelular y está principalmente formado por la región N-terminal de la subunidad α (Montal, 2002). La estructura de estos sitios es similar a la de un bolsillo, el cual está formado por aminoácidos aromáticos que estabilizan al grupo amonio (positivamente marcado) de la molécula de ACh (Corringer et al., 2000).

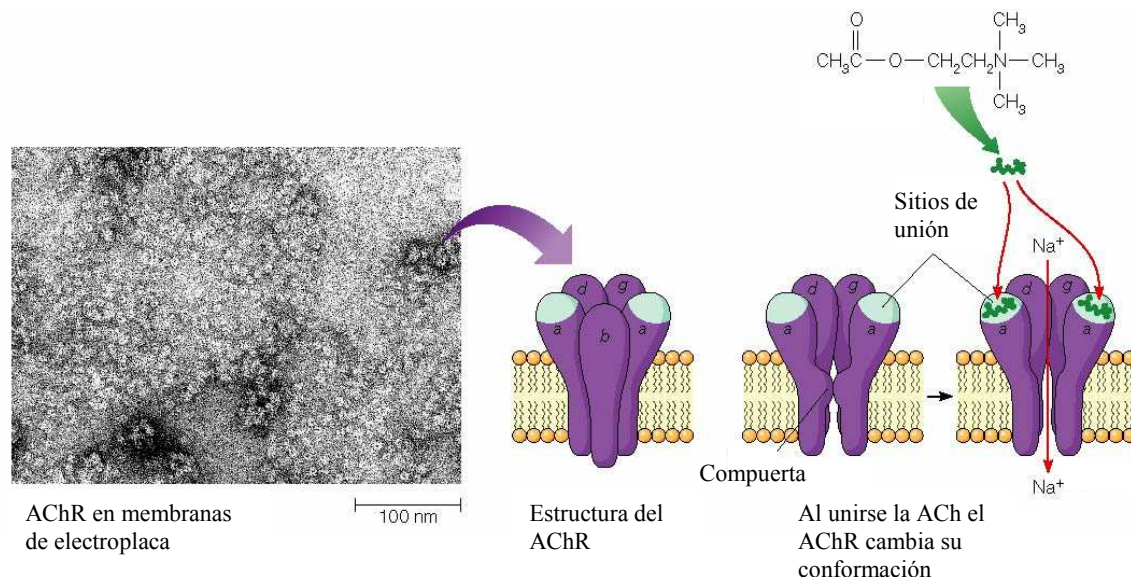


Figura 7.

Esquema que muestra la apertura del AChR tras la unión de su ligando natural. Tomado de <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-13/CB13.html>.

Después que el agonista se une a estas estructuras con forma de bolsillo, establece con ellas un número de interacciones que resultarán en última instancia en la apertura del AChR. Se ha propuesto un modelo para los dos sitios de unión de la ACh al receptor. En dicho modelo se plantea que las subunidades δ y ϵ junto con las subunidades α forman siete lazos de unión, los cuales reciben la denominación de lazos A-G. Tres de ellos A, B y C pertenecen a la subunidad α y los residuos que los delimitan son: Trp 86 y Trp 93 (lazo A) (Galzi et al., 1990), Trp 149 y Trp 151 (lazo B) (Galzi et al., 1991; Sine et al., 1995b), y Trp 190, Cys 192, Cys 193 y Trp 198 (lazo C) (Abramson et al., 1989; Sine et al., 1994; Malany et al., 2000). Estas cisteínas adyacentes están unidas por un puente disulfuro (Kao

y Karlin, 1986). La reducción de enlaces disulfuro causa una disminución en la afinidad por agonistas colinérgicos (Walker et al., 1981), al igual que su sustitución por serinas (Mishina et al., 1985), lo que evidencia un rol importante en el reconocimiento y en la unión del ligando. Existe también otro puente disulfuro en la parte citoplasmática de la subunidad α (Cys 128-Cys 142) que forma un lazo altamente conservado dentro de la familia *Cys-loop* y es muy importante para el correcto ensamblado del receptor (Green y Wanamaker, 1997; Green, 1998). Estudios mutacionales en los residuos de los lazos A, B y C confirmaron la importancia funcional en la unión del ligando, ya que en todos los casos estudiados se produjo una disminución de la afinidad aparente del receptor por la ACh (Pedersen y Cohen, 1990; O'Leary y White, 1992; Tomaselli et al., 1991).

Los cuatro lazos restantes, D, E, F y G, son aportados por las subunidades γ y δ y los aminoácidos que los constituyen son: γ Lys 34/ δ Ser 36 (lazo D) (Sine et al., 1995; Bren y Sine, 2000); γ Trp 55/ δ Trp 57 y γ Glu 57/ δ Asp 59 (lazo E) (Chiara et al., 1998; Bren y Sine, 1997); γ Ser 111/ δ Tyr 113, γ Cys 115/ δ Tyr 117, γ Ile 116/ δ Val 118 y γ Tyr117/ δ Thr 119 (lazo F) (Ohno et al., 1996; Sine, 1993, 1997, 1995) y finalmente el lazo G constituido por γ Fen 172/ δ Ile178, γ Asp 180/ δ Asp 174 y γ Glu 189/ δ Glu 183(Martín et al., 1996).

2.9) Estructura del canal iónico

Estudios realizados sobre el canal iónico del AChR de *Torpedo* determinaron que la molécula del receptor es un cilindro de ~ 20 Å de diámetro y ~ 110 Å de altura, de los cuales ~ 65 Å se extienden hacia el espacio sináptico mientras que ~ 15 Å lo hacen hacia el interior de la célula (Unwin, 1993) con un eje de pseudosimetría perpendicular al plano de la membrana.

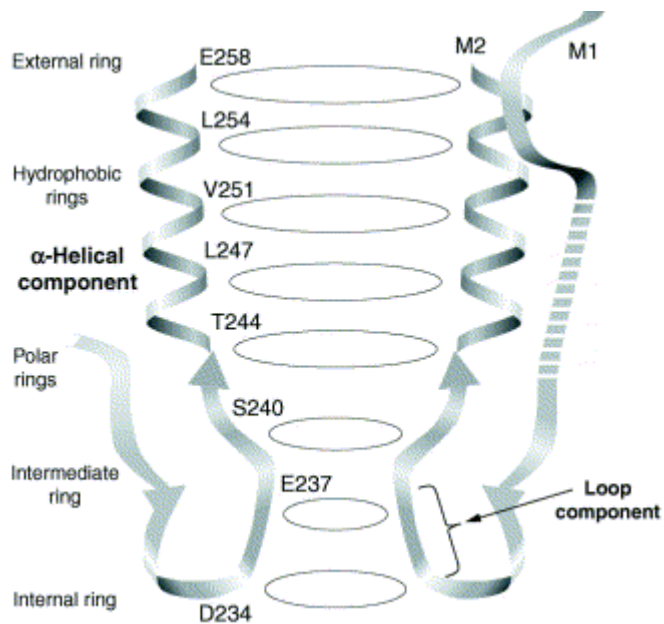


Figura 8.

Distribución funcional del canal iónico. La Figura muestra el canal iónico formado por los segmentos M2 de las distintas subunidades, con los anillos que constituyen las paredes del canal. (Extraído de Changeux y Edelstein, 2001).

El poro iónico del canal está formado por las hélices α de los segmentos M2 de las cinco subunidades (Figura 8). Por detrás de los segmentos M2, los segmentos transmembranales M1 y M3 se encuentran formando un anillo intermedio; y por último, en la periferia del canal iónico se encuentran cinco hélices α de los segmentos M4, constituyendo el anillo externo (Barrantes, 2003).

Existen cavidades entre las hélices de M2 y las externas, llenas de agua que se cree que son esenciales para el mecanismo de gatillado del AChR al proveer el espacio necesario para que se produzcan los cambios conformacionales que induce la unión del agonista para la apertura del canal iónico (Miyazawa et al., 2003).

2.10) Conductancia iónica y filtro de selectividad

Tras la unión de dos moléculas de ACh al AChR se produce en este último un cambio conformacional en la proteína que conduce a la apertura del canal iónico, permitiendo el flujo de iones a favor del gradiente de concentración (Figura7). Esto implica, en condiciones fisiológicas, la entrada de miles de iones sodio en menos de un milisegundo al interior de la

célula, produciéndose entonces una despolarización transitoria que dará lugar a una respuesta celular. Los cationes entran al canal a través del vestíbulo extracelular conformado por el dominio extracelular o a través de aperturas laterales las cuales son encontradas a lo largo de la interfase entre las subunidades (Miyazawa et al., 2003). La apertura del canal se produce en respuesta a pulsos de ACh en una concentración en el orden de 10^{-6} a 10^{-4} M. Luego de provocar la apertura del canal la ACh puede disociarse rápidamente del AChR -ya que la ACh posee baja afinidad por el receptor- lo que permite que este último pueda volver a actuar. Cabe resaltar que en ausencia de agonista, la probabilidad de que el AChR se abra es muy baja (10^{-4} , Jackson, 1984).

2.11) La compuerta

Como se muestra en la Figuras 6 y 8, distintos anillos conforman el poro del canal. Más específicamente, a la altura del punto medio de la membrana plasmática el receptor se vuelve estrecho debido a que la separación de los segmentos transmembranales M2 del AChR es muy pequeña. Se cree que los residuos α V251 y α L255 son los responsables de generar una barrera energética por medio del contacto entre los aminoácidos vecinos para el pasaje de iones y conformarían la compuerta del AChR. La distancia que se crea entre las fuerzas de Van der Waals de estos residuos es menor que el diámetro de un ión sodio o potasio que mantiene su capa de hidratación, por lo que no existe una oclusión física del AChR. Se puede decir entonces, que la conductancia iónica a través del canal esta bloqueada o controlada para no permitir el pasaje de iones a través del AChR (Miyazawa et al., 2003).

2.12) Mecanismo de activación del AChR

Hasta el día de hoy no se ha logrado dilucidar en términos atomísticos el mecanismo por el cual las moléculas de agonista provocan la apertura del canal. Se sabe que componentes del dominio N-terminal de los LGICs participan activamente en la comunicación entre el dominio extracelular y el transmembrana. En efecto, tras la unión del agonista se

desencadena una serie de cambios conformacionales que se propagan por toda la proteína con la consecuente apertura del canal. Se ha propuesto que las subunidades α son los principales mediadores de los cambios conformacionales que permiten la apertura o cierre del canal. Las otras subunidades también contribuyen e influyen sobre la unión de la ACh a la vez que estabilizan a la subunidad α cuando el receptor se encuentra cerrado.

2.13) Aspectos generales de la función del AChR

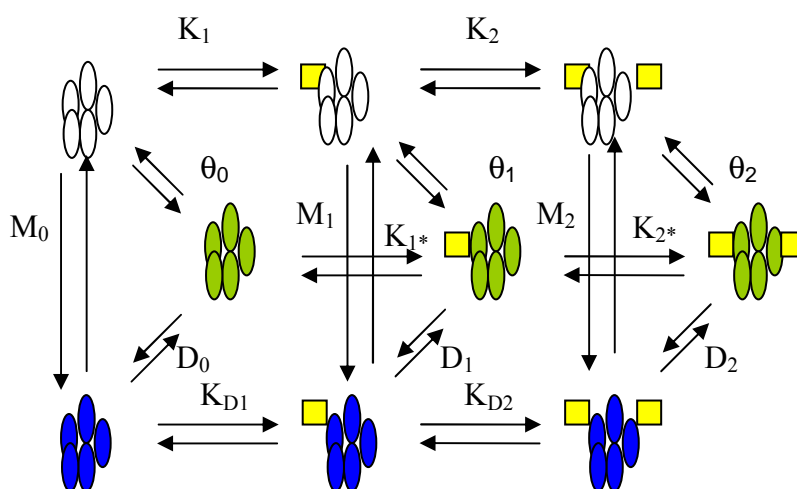
El AChR es una proteína alostérica compleja que contiene múltiples sitios alostéricos a través de los cuales su función puede ser modulada. En 1995, Monod-Wyman-Changeux propusieron un modelo para describir la naturaleza alostérica del AChR (Monod et al., 1965; Changeux y Edelstein, 1998).

El AChR posee tres estados funcionales básicos: abierto, cerrado y desensibilizado (Katz y Thesleff, 1957). El primero es el único estado conductor que permite el flujo de iones mientras que los otros dos son no conductores. El estado cerrado es más estable en ausencia del agonista mientras que en presencia del mismo se estabiliza el estado desensibilizado del receptor. La activación del AChR es un proceso rápido (μs a ms) mientras que la desensibilización es un proceso complejo, más lento, con pasos que transcurren en lapsos de milisegundos a minutos. Cabe destacar que existen diferencias en las velocidades de activación o desensibilización según el tipo de AChR que se trate.

En *Torpedo* los AChRs se encuentran en un 80% en estado de reposo y el 20% restante en estado desensibilizado (Heidmann y Changeux, 1979). Para los AChRs expresados en mamíferos, más del 90% se encuentra en estado de reposo en ausencia de agonistas (Franke et al., 1993) y en el caso de AChR neurales la proporción de AChR en reposo con respecto a los AChR en estado desensibilizados varía dependiendo del subtipo de receptor ~ el 60% en $\alpha 4\beta 2$ y menos del 1% para los $\alpha 7$ AChR (Quick y Lester, 2002).

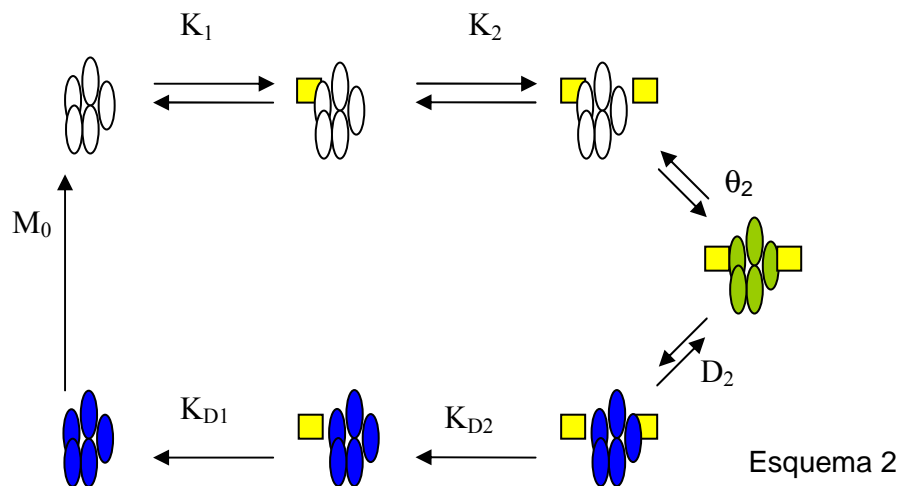
Para retornar al estado de reposo una vez que el AChR ha alcanzado el estado desensibilizado es necesario pasar por los estados cerrados (Changeux y Edelstein, 1998; Dilger y Liu, 1992).

La unión de un agonista al sitio de unión de la ACh estabiliza el estado activo del receptor. El Esquema 1 (abajo) muestra en blanco a los receptores en su estado cerrado en presencia o ausencia del agonista; en verde, se indica que puede producirse una activación espontánea del AChR en ausencia de agonista (baja frecuencia) así como también una activación del receptor por la unión de una sola molécula de agonista (receptor monoligado) o lo más probable por la unión de dos moléculas de agonista (receptor biligado). En el último nivel, en azul, se muestran los estados desensibilizados, indistinguibles uno de otro. La constante de equilibrio de gatillado del canal (θ), aumenta a medida que aumenta la ocupación del agonista sobre el AChR. Consecuentemente $\theta_2 > \theta_1 > \theta_0$. Para el AChR muscular $\theta_0 \sim 10^6$, $\theta_1 \sim 10^2$ y $\theta_2 \sim (10^1 - 10^2)$ (Engel et al., 2002). D es la constante de equilibrio de desensibilización desde el receptor abierto y K, K^* y K_D son las constantes de disociación del sitio de unión de ACh en los estados de reposo, estado activo y desensibilizado, respectivamente. Según Dilger y Liu (1992), el AChR se desensibiliza principalmente desde el estado abierto biligado.

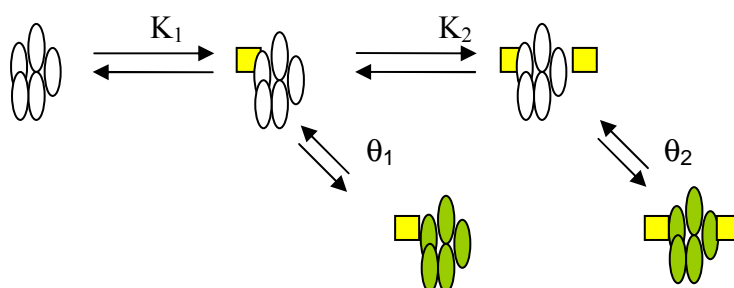


Esquema 1

Teniendo en cuenta a) que en ausencia de agonista la frecuencia de apertura es muy baja (Jackson, 1984), b) que el receptor se desensibiliza principalmente a través del estado abierto biligado (Dilger y Liu, 1992; Auerbach y Akk, 1998), y c) que la recuperación de la desensibilización en ausencia de agonista ocurre a través del camino desensibilizado (Dilger y Liu, 1992) el Esquema 1 puede ser simplificado de la siguiente manera:



Cuando se realizan estudios funcionales con la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* en la configuración de célula adherida ("*cell-attached*"), los múltiples estados desensibilizados no pueden ser diferenciados entre sí, debido a que es no posible determinar el número de canales que se encuentran en la porción de membrana aislada. En consecuencia, se puede describir la cinética del AChR a través del Esquema 3.



También existen ligandos que pueden unirse a sitios “alostéricos” ubicados a cierta distancia del sitio de unión de la ACh. Dichos ligandos pueden modular las señales del AChR afectando el equilibrio entre los estados de reposo, activo o afectando la cinética de desensibilización. Estos moduladores pueden comportarse como agonistas o como antagonistas.

2.14) Modulación de los receptores de la familia Cys-loop

Numerosos fármacos afectan las transiciones entre los diferentes estados conformacionales del receptor (reposo, abierto y desensibilizado). Algunos compuestos actúan en el sitio de acción del ligando, ya sea ejerciendo su acción como agonistas o como antagonistas competitivos, mientras que otros actúan a otros niveles actuando como antagonistas no competitivos (INC). Estos inhibidores comprenden un amplio rango de compuestos en lo que respecta a estructuras químicas y mecanismos de acción, y ejercen su acción por distintos mecanismos. Estos compuestos pueden producir el bloqueo del canal iónico, inhibición alostérica o aumento de la velocidad de desensibilización con la consecuente disminución de la probabilidad de apertura del canal.

2.15) Agonistas

Las respuestas farmacológicas de los distintos tipos de AChRs a diversos compuestos agonistas (ACh, nicotina, epibatidina, succinilcolina, etc.) son, en términos generales, bastante similares, diferenciándose en la potencia relativa que ejercen sobre el subtipo de receptor. En el caso del AChR muscular de tipo embrionario, la potencia de distintos agonistas es ACh > epibatidina > succinilcolina ~ nicotina, mientras que para el AChR neuronal $\alpha 7$ el orden de potencias es epibatidina > nicotina > ACh (Alexander et al., 2001).

Otro tipo de agonistas son los agonistas parciales. Éstos tienen la propiedad de unirse al sitio activo del receptor pero producen una respuesta inferior a la máxima. En presencia del

agonista total, compiten con éste por el sitio activo del canal, disminuyendo la respuesta máxima del primero (Ross, 1993; Liu y Dilger, 1993).

2.16) Bloqueo del canal

Según el mecanismo de acción por el cual los INCs efectúan el bloqueo del canal, éstos pueden ser clasificados en:

1. Bloqueadores de canal abierto, los cuales ocluyen el poro del canal iónico. Este bloqueo puede producirse en forma lenta, intermedia o rápida.
2. Bloqueadores de canal cerrado, los cuales se unen al canal cerrado no permitiendo la apertura o reapertura del mismo.

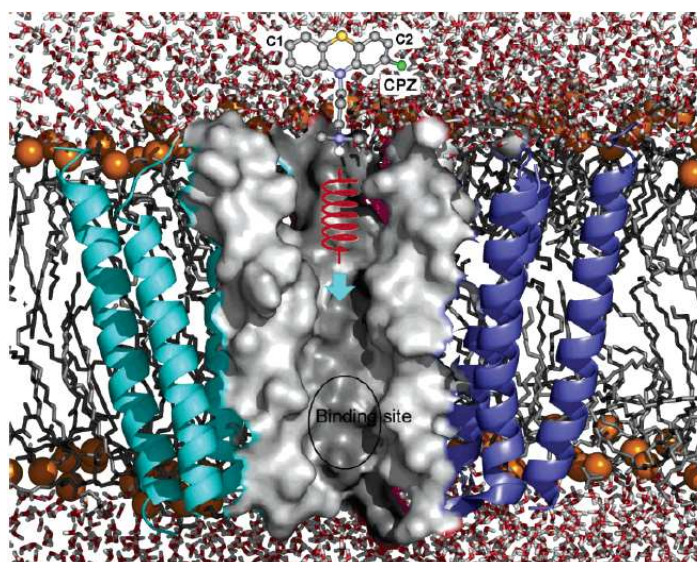


Figura 9.

Se esquematiza a la Clorpromazina (CPZ) bloqueando el poro del canal iónico del AChR. Extraído de Xu et al. (2006).

2.17) Inhibición alostérica

Como se dijo anteriormente, la inhibición es alostérica cuando un compuesto se une a un lugar diferente del sitio de unión del agonista natural y del poro iónico disminuyendo su respuesta.

2.18) Desensibilización

El proceso de desensibilización se produce tras una estimulación repetida o continua del agonista con la consecuente pérdida o disminución de función de la respuesta biológica. Este estado desensibilizado es un estado no conductor de iones. Cabe destacar que la desensibilización de los LGICs tiene un papel importante en procesos biológicos como la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Nishisaki et al., 2000).

3) ¿Por qué se estudia el AChR?

Los AChR se encuentran en todo el organismo; como receptores neuronales en el SNC y SNP, y como receptores neuromusculares en la placa motora de los músculos somáticos. Están involucrados con casi todas las funciones fisiológicas, incluyendo la respiración, el movimiento, la cognición, la memoria y el temperamento. Estudiar la función del receptor de acetilcolina nicotínico con un enfoque bioquímico, biofísico y molecular ayudará a comprender mejor la fisiología del AChR. Esto a su vez contribuirá a la búsqueda de nuevas terapias para enfermedades relacionadas con el receptor nicotínico, como algunos tipos de epilepsia (Barrantes, 1998), el Alzheimer, la esquizofrenia, el síndrome miasténico congénito, el Parkinson y la adicción a la nicotina.

El desarrollo de drogas para tratar la epilepsia ha sido orientado a tratar la sintomatología de la enfermedad; es decir, la supresión de los ataques epilépticos. Aunque a la fecha no se comprendan con total claridad los mecanismos de acción de las drogas anticonvulsivantes se entiende que ejercen su acción modulando el equilibrio entre la excitación y la inhibición de las sinapsis (White, 1999). A nivel celular se reconocen tres mecanismos básicos (Stefan y Feuerstein, 2007):

Modulación de canales iónicos dependientes de voltaje (Na⁺, Ca²⁺, K⁺)

Estimulación de las sinapsis inhibitorias (GABA)

Inhibición de las sinapsis excitatorias (particularmente las mediadas por glutamato)

A potenciales normales de membrana, la mayor parte de los canales de Na^+ existen en un estado cerrado (reposo). Al producirse la despolarización de la membrana, el canal se activa, facilitando el flujo del ión al interior celular. Luego el canal entra en un estado de inactivación, del cual no es fácilmente reactivado. Al repolarizarse la membrana neuronal el canal vuelve al estado de reposo (Catterall, 1992; Ragsdale y Abolí, 1998). Los canales de Na^+ pueden pasar por estos estados funcionales en lapsos de milisegundos. Esta característica es esencial para sostener los estallidos de potenciales de acción necesarios para algunas funciones normales cerebrales. Sin embargo, un desequilibrio en este proceso podría tener relación con la producción de descargas epilépticas. Por ello, los blancos de las drogas anticonvulsivantes apuntan a estos canales de sodio (Upton, 1994; Macdonald y Kelly, 1995; Meldrum, 1996; White, 1999).

Dentro del amplio espectro de fármacos anticonvulsivos se encuentra la Lamotrigina, aprobada para uso clínico desde el año 1993. La Lamotrigina (LTG) es una feniltiazina (ver Figura 1, capítulo 1). Su principal mecanismo de acción es el bloqueo de canales de sodio y calcio activados por voltaje (Stefani et al., 1997, 1998a, 1998b). De esta manera la LTG actúa presinápticamente inhibiendo la liberación de neurotransmisores y postsinápticamente disminuyendo la excitabilidad de neuronas, mediante el bloqueo de los canales de sodio (Wang et al., 1996; Rogawski y Löscher, 2004) y también reduciendo las corrientes generadas por canales de calcio activados por voltaje (Stefani et al., 1997).

Como se mencionó anteriormente, el AChR muscular, una vez activado por su ligando, es un canal conductor de sodio, mientras que el $\alpha 7$ AChR es principalmente permeable al calcio. Por lo tanto, una vez que se produce la interacción entre el receptor y su ligando se promueve la despolarización de la célula que expresa estos receptores en su membrana plasmática.

El objetivo principal de esta Tesis es estudiar si la LTG interactúa con los receptores de acetilcolina nicotínicos. En particular, se intentó determinar si los AChR pueden ser blancos de acción de la LTG por ser conductores de iones Na^+ y Ca^{2+} luego de la unión a su ligando natural, la ACh.

Materiales y Métodos

1) Expresión de receptores de ACh en distintas líneas celulares

Líneas celulares utilizadas y generadas

CHO-K1

La línea celular CHO-K1 se cultivó en medio de HAM F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino en un incubador Napco modelo 6100 a 37° C y 5% de CO₂ y utilizando CMF-tripsina para desprender a las células del frasco en el cual crecieron y proceder a repicarlas.

CHO-K1/A5

La línea celular CHO-K1/A5 fue desarrollada en el laboratorio del Dr. Barrantes a partir de la línea celular CHO-K1. Esta línea celular expresa en forma heteróloga y estable el AChR muscular murino adulto (Roccamo et al., 1999). Las células se cultivaron en condiciones idénticas a las células parentales CHO-K1, excepto que el medio contenía 40 µg/ml de G418 (antibiótico de selección).

CHOK1-α7-GFP

La línea celular CHO-K1 se tranfectó en el laboratorio en forma estable con la subunidad α7 del AChR unida a la proteína fluorescente verde (GFP). Las células se cultivaron en condiciones idénticas a las células parentales CHO-K1/A5.

CHO-K1/SPH⁻

Esta línea celular deriva de las CHO-K1. Presenta una mutación que afecta a proteínas reguladoras de vías metabólicas que modifican el contenido endógeno de esfingomielina (Roccamo et al., 1999). En esta línea celular la enzima serina palmitoil transferasa se encuentra inhibida. A temperaturas de cultivo entre 33°C y 37°C la actividad de la enzima disminuye a niveles que representan tan sólo del 4 al 8% de la actividad normal, lo cual permite llevar los niveles celulares de esfingomielina y gangliósidos como el GM3 a valores menores al 1% con respecto al de los controles. Las células CHO-K1/SPH⁻ también se tranfectaron en forma estable con las subunidades correspondientes al AChR muscular. Las

células se cultivaron en medio de HAM F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino y con 40 µg/ml de G418 en un incubador Napco modelo 6100 a 37° C y 5% de CO₂. Se desprendieron las células para los repiques con CMF- Tripsina.

SHE-P1 null

La línea celular SHE-P1 null se cultivó en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo en incubador Napco modelo 6100 a 37°C y 5% de CO₂. Para los repiques se utilizó CMF- tripsina.

SHE-P1-hα7

La línea celular SHE-P1-hα7 (Peng et al., 1999) se cultivó en DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo e Hygromicina B (antibiótico de selección para la subunidad α7 del AChR) en un incubador Napco modelo 6100 a 37°C y 5% de CO₂. Para los repiques se utilizó CMF- tripsina.

SHE-P1-hα7-Ric-3

A partir de la línea celular SHE-P1-hα7 (Peng et al., 1999) se obtuvo en el laboratorio la línea celular SHE-P1-hα7-Ric-3 que expresa en forma estable al α7 AChR neuronal y la proteína chaperona Ric-3. Para tal fin se transfectaron células SHE-P1-hα7 con el plásmido que codifica para Ric-3 usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche, Indianapolis). Este es un reactivo compuesto por lípidos catiónicos que facilita el ingreso del ADN plasmídico al interior celular. A las 48 hs del proceso de transfección se inició la selección de clones adicionando al medio de incubación de las células SHE-P1-hα7, 400 µg/ml de G418 (antibiótico de selección para la proteína Ric-3). A los cultivos se les cambió este medio (medio de selección) cada 2 ó 4 días para eliminar células muertas hasta la aparición de clones estables. Una vez establecida la nueva línea celular, se la cultivó rutinariamente con 40 µg/ml de G418 e Hygromicina B en medio DMEM, suplementado con 5% de suero fetal bovino y 10% de suero de caballo en un incubador Napco modelo 6100 a 37°C y 5% de

CO₂. También en este caso utilizamos CMF- Tripsina para disociar las células para los repiques.

2) Registros de *Patch-clamp*

Entre las mejores estrategias experimentales para evaluar funcionalidad de los receptores celulares se destacan, sin duda, las electrofisiológicas. La técnica de *patch-clamp* constituyó en la década de los 70 y 80 una verdadera revolución, ya que era la primera aproximación experimental que permitía interrogar la función de una macromolécula en una célula viviente con resolución de molécula única. Con esta metodología es posible estudiar el funcionamiento de cada molécula como así también el total de los canales expresados en la misma (Hamill et al., 1981). En el siguiente diagrama se muestran algunas de las distintas configuraciones que se pueden obtener por esta técnica:

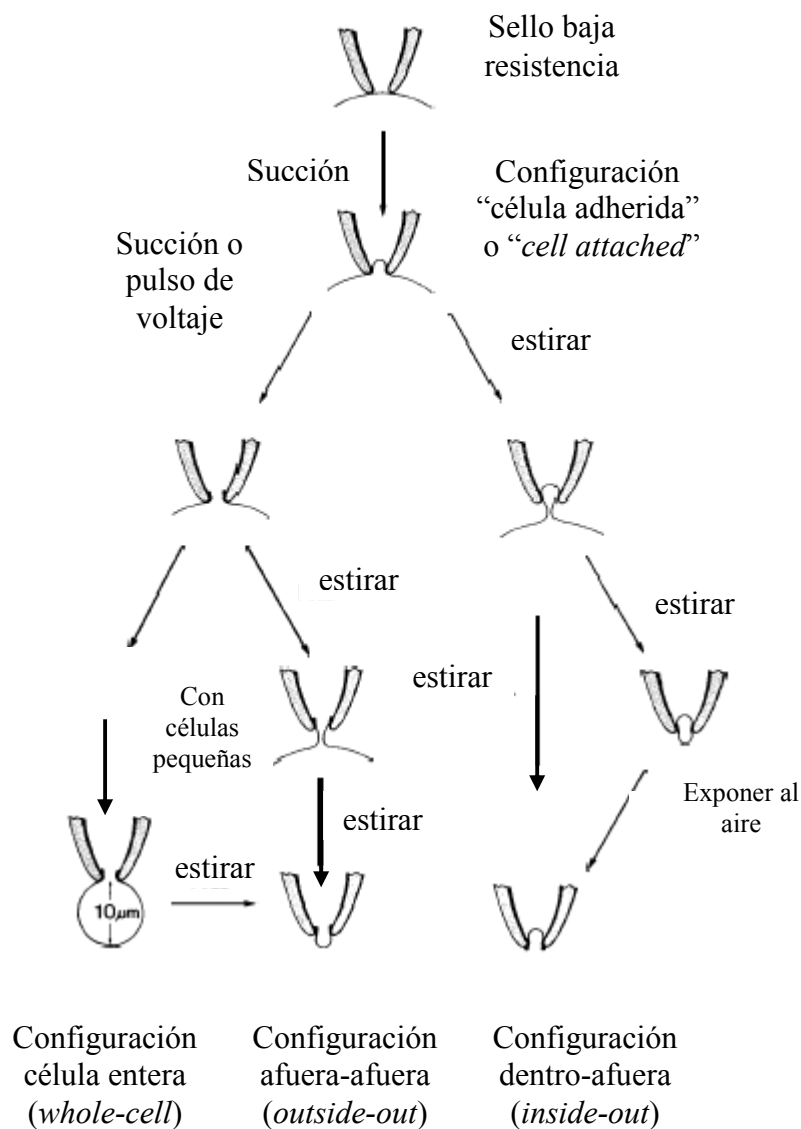


Figura 1.

Representación esquemática de las posibles configuraciones que pueden usarse en electrofisiología con la técnica de *patch-clamp*. Extraído y modificado de Hamill et al., 1981.

2.1) Registros en la configuración "célula adherida" (*cell-attached*)

Esta técnica consiste en aproximarse con una pipeta de vidrio a una célula que expresa canales en su superficie, para formar un "sello" eléctrico entre el vidrio de la pipeta y la superficie celular, con una resistencia de aproximadamente 50 M Ω (Figura 1). De esta forma, el pasaje de cargas entre el vidrio de la pipeta y la superficie celular es mínimo, por lo que el mayor flujo de cargas se producirá entre el interior de la célula y la pipeta. Para

obtener un sello de alta resistencia (gigaohms) es necesario aplicar succión con lo que se minimiza aún más la fuga de iones. La pipeta se encuentra conectada a un circuito amplificador de corriente que permite registrar las corrientes iónicas generadas en el parche ("patch") o área de membrana abarcada por la pipeta.

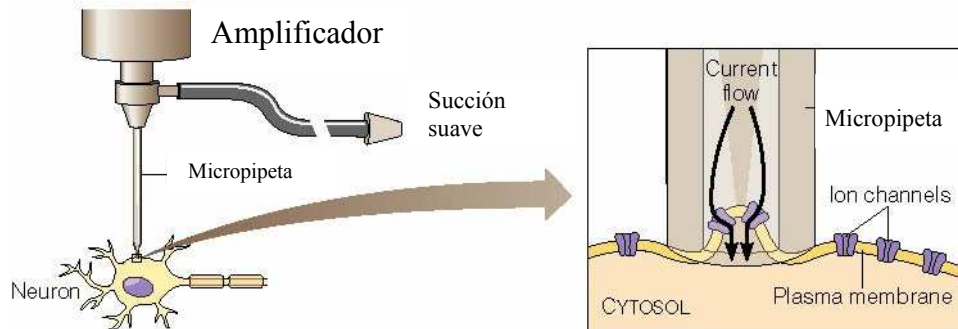


Figura 2.

El esquema representa la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula adherida ("cell-attached"). Tomado y modificado de la página web: <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-13/CB13.html>.

2.1.1) Pipetas

Se utilizaron tubos capilares Kimax-51 (Kimble Products, Vineland, NJ, USA) los cuales se cortaron con un estirador de pipetas vertical (David Kopf, Tujunga, CA, USA, modelo 700C) en dos estiramientos sucesivos. El primero se realizó a 19 amperes y con una distancia de estiramiento de 6 mm. De esta forma se produce un estrangulamiento en el capilar. A continuación se centra con respecto a la resistencia de alambre del estirador y se realiza un segundo estiramiento a 16 amperes. A través de este procedimiento se obtienen dos pipetas iguales con una resistencia entre 5-7 M Ω las cuales son recubiertas con *Coat D* (M-Line accessories, Measurements Group, Raleigh, NC, USA) para disminuir la capacitancia existente entre el baño y la pipeta. Se forma una superficie más hidrofóbica por la aplicación de esta resina acrílica con un pincel lo más próximo a la punta de la pipeta como sea

posible y se extiende 1 cm en sentido opuesto. La resina se cura por exposición al aire a temperatura ambiente por 24 hs. A continuación, se pulen las pipetas por calor utilizando una microforja montada sobre un microscopio con un objetivo de 20X. Cada pipeta se pule acercando su punta durante unos segundos a un alambre de platino que contiene una esfera de vidrio que absorbe el calor proporcionado por la microforja (1,1-1,2 mV). El llenado de las pipetas se realiza en dos partes. Primero se llena la punta de la pipeta con la solución de trabajo en la que se disuelve el agonista o droga en estudio, succionando con una jeringa por la parte posterior de la misma. Seguidamente, se llena con esta misma solución por la parte posterior con jeringa y aguja. En ambos casos la solución de trabajo se pasa por un filtro de 0,2 μm para evitar obstrucción de la pipeta.

2.1.2) Buffer de incubación de las células empleado durante los experimentos

En la configuración célula adherida, la composición del baño en el que se encuentran las células y la usada para disolver al agonista o droga en estudio es la misma. Esta contiene: 142 mM de KCl, 5,4 mM de NaCl, 1,8 mM CaCl_2 , 1,7 mM MgCl_2 y 10 mM HEPES (pH 7,4).

2.1.3) Drogas y agonistas utilizados

Para realizar los registros bajo la configuración “*cell-attached*” las drogas que se detallan a continuación fueron agregadas a la solución de la pipeta.

Acetilcolina

La ACh (Sigma Chemical CO, St. Louis, MA. USA), conservada en una solución stock 10 mM congelada, se disolvió en la solución de trabajo a una concentración final de 1 μM y 30 μM en la pipeta del registro.

Lamotrigina

El anticonvulsivante Lamotrigina (6-(2,3-diclorofenil) 1,2,4-triazina-3,5-diamina) de GlaxoSmithKline Co. (Durham, UK) se preparó a partir de una solución madre cuya concentración fue de 10 mM en etanol, disuelto finalmente en la solución de trabajo. Para

esto fue necesario evaporar el etanol a sequedad bajo atmósfera de N_2 y resuspenderlo en la solución de trabajo por medio de ciclos de sonicación en un amplio rango de concentraciones (0,05 - 400 μ M) para su posterior incorporación a la pipeta del registro.

2.1.4) Potencial de membrana

La funcionalidad de los canales luego de la exposición al compuesto en estudio, se evaluó a un potencial de membrana entre -70 y -80 mV. Para estudiar si existían cambios cinéticos en función del voltaje de membrana aplicado se realizaron los registros electrofisiológicos a distintos potenciales de membrana: +70, +40, 0, -40, -70, -80 y -120 mV.

Para comprobar la funcionalidad de los $\alpha 7$ AChRs expresados en células SHE-P1-h $\alpha 7$ y SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3 se realizaron registros aplicando un amplio rango de potenciales de membrana a las células, desde -100mV a +100 mV.

2.1.5) Registros electrofisiológicos

El equipo está conformado por un microscopio invertido (Nikon) montado sobre una mesa anti-vibratoria neumática con el fin de reducir las vibraciones hasta unos pocos Hertz, lo que es necesario para obtener sellos estables. El objetivo utilizado es de 20X. Con el fin de eliminar el ruido eléctrico, el microscopio se encuentra dentro de una jaula de Faraday. La pipeta se coloca en un “*holder*” de plástico con roscas de teflón. El *holder* contiene un electrodo de platino que se conecta con un amplificador por el otro extremo. Antes de ser utilizados, los electrodos se cloran sumergiéndolos en hipoclorito concentrado. El *holder* se encuentra montado sobre un micromanipulador que permite el desplazamiento adecuado de la pipeta con respecto a la célula. Dentro del baño de la cápsula que contiene a las células se encuentra un electrodo de referencia, construido también con alambre de plata clorado. Este también se encuentra conectado al amplificador por el extremo opuesto.

Las corrientes generadas por los AChRs se registraron usando un amplificador de corriente AXOPatch 200B (Axon Instruments, Burlingame, CA, USA). Los datos se digitalizaron con

una interfase ITC-16 (Instrutech Corporation, Long Island, NY, USA). El programa de adquisición continua utilizado fue Acquire (Bruxton Corporation, Seattle, WA, USA).

2.1.6) Análisis de canales

Los registros se analizaron con un filtro gaussiano digital de 5 kHz con el programa TAC (Bruxton Corporation, Seattle, WA, USA) utilizando el criterio de umbral de amplitud media. Este filtro permite mejorar la relación señal/ruido. Los datos analizados en este programa son divididos en "segmentos", que corresponden a secuencias de datos colectados en un intervalo de tiempo determinado. Para los registros de corrientes analizados en esta Tesis se adoptó el procedimiento de adquirir 100.000 puntos de datos por cada "segmento", lo que determina una duración de 0,57 segundos por segmento. La selección de las trazas individuales se realizó en forma interactiva, a través de un cursor que propone eventos de apertura (nivel 1) y cierre (nivel 0) del canal, a la vez que señala la amplitud (pA) del mismo. La aceptación de estos eventos determina que el conjunto de datos estén clasificados en dos niveles, 1 y 0. Para el análisis no son tenidos en cuenta los eventos de aperturas múltiples, que corresponden a la apertura simultánea de más de un canal (niveles 2,3, etc). Para cada registro se analizaron más de 1000 eventos de apertura y cierre del canal. Los datos obtenidos del análisis se volcaron al programa TACFit (Bruxton Corporation, Seattle, WA, USA) a partir del cual se construyeron histogramas de amplitud, tiempo de estado abierto, cerrado y de estallido ("*bursts*") del canal. Definimos un estallido del canal como episodios de apertura y cierre de un mismo canal, independiente de la concentración del agonista. Con excepción del histograma de amplitud, todos los histogramas restantes se construyen con abscisa logarítmica y ordenada lineal y son ajustados a la suma de funciones exponenciales por máxima probabilidad. Del análisis de estos histogramas se obtiene información de las propiedades cinéticas del canal y puede determinarse cómo se modifican estos parámetros por acción de distintos compuestos.

2.2) Registros en la configuración “célula entera” (*whole-cell*)

Mediante la configuración de célula entera o “*whole-cell*” se obtienen corrientes macroscópicas, es decir, la suma de las corrientes individuales de todos los receptores presentes en una célula.

Una vez realizado el sello, éste se rompe por succión y de esta manera se obtiene la configuración electrofisiológica de *whole-cell* (Figura 1). A diferencia de la configuración *cell-attached* el contenido de la pipeta se comunica con todo el interior de la célula. A continuación, se eleva del fondo de la cápsula la pipeta y con ella a la célula, la cual se expone al flujo generado por un sistema de perfusión rápida, que consta de tres tubos orientados a 90°. El sistema de perfusión rápido permite el intercambio de soluciones, a las cuales está expuesta la célula, en el curso de decenas de milisegundos. Inicialmente se expone a la célula a un primer tubo que libera en forma continua una solución extracelular tamponada. Bajo la aplicación de un impulso eléctrico el primer tubo se desplaza lateralmente y la célula es expuesta a un segundo tubo, que contiene la solución extracelular más un agonista o droga a la cual se quiere exponer a los AChRs. La duración de este pulso es determinada por el operador; transcurrido el intervalo elegido se vuelve a posicionar el primer tubo frente a la célula, sometiendo a la misma a una nueva exposición a la solución extracelular, que lava el efecto de la droga aplicada en el paso anterior.

2.2.1) Solución intracelular (ICS)

Esta solución intenta simular la concentración iónica del interior celular, ya que la pipeta está conectada con el interior de la célula. La ICS esta compuesta por: 140 mM KCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂ y 10 mM Hepes (pH 7,4).

2.2.2) Solución extracelular (ECS)

Esta solución fluye en forma continua por el sistema de perfusión, pudiendo contener momentáneamente al agonista al que van a ser expuestas las células y constituyendo

también el medio del baño en el que se encuentran las mismas. Su composición es la siguiente: 150 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 5mM MgCl₂ y 10 mM Hepes (pH 7,4).

2.2.3) Drogas y agonistas utilizados

Para realizar los registros en la configuración *whole-cell* se agregaron las drogas que se detallan a continuación por el sistema de perfusión.

Acetilcolina

La ACh (Sigma Chemical CO, St. Louis, MA. USA), se preparó y conservó congelada en una solución stock 10 mM. Para los experimentos se la disolvió en la ECS a una concentración final de 50 µM.

Lamotrigina

El anticonvulsivo LTG de GlaxoSmithKline Co. (Durham, UK) se preparó en iguales condiciones que para los registros a nivel de canal único pero esta vez se disolvió en la ECS a una concentración final 100 µM.

3) Medición de unión de ligandos

Para realizar estudios de tipo farmacológico se efectuaron ensayos de unión a α-BTX (de *Bungarus multicinctus*) marcada con [¹²⁵I] (New England Nuclear, Dupont, Boston M.A. USA). La alta afinidad del receptor hacia esta toxina permite una determinación cuantitativa, altamente específica y relativamente sencilla.

3.1) Derivatización y separación de α-BTX [¹²⁵I]

Para obtener α-BTX[¹²⁵I] se siguió el método de Hunter y colaboradores (1962). Se disolvieron 20 nmoles de α-BTX en *buffer* fosfato sódico (100 mM, pH 7.4). Se incorporaron a la toxina, 0,5 mCi de [¹²⁵I] Na (A.E. 17.00 Ci/g) y 40 mg/ml de Cloramina T. La reacción se detuvo luego de 2 minutos por el agregado de 40 mg/ml de metabisulfito de sodio. A continuación el producto de esta reacción se sembró en una columna de Sephadex G-25

equilibrada con el mismo *buffer* y mantenida a 4°C. Este procedimiento permitió separar la bungarotoxina iodada del excedente de yodo radioactivo, con un perfil de elución como se muestra en la siguiente figura:

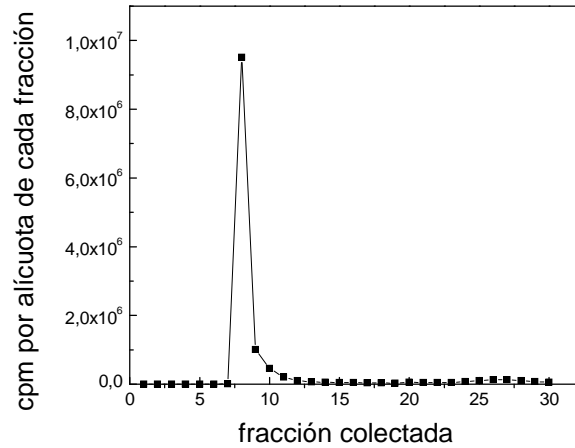


Figura 3.

Se muestra el perfil de elución de α -BTX [^{125}I].

Se colectaron alícuotas de 1 ml y se destinaron 10 μl de cada alícuota para determinar el nivel de radioactividad, en un contador *Gama* en el Centro de Medicina Nuclear de Bahía Blanca y en el laboratorio IACA de Bahía Blanca. Se calculó la actividad específica según lo indican Hanley y colaboradores (1977), se la fraccionó en volúmenes de 100 μl y se la conservó a -20°C durante 30 -45 días, período en el que se realizaron los experimentos.

3.2) Determinación de la unión de α -BTX [^{125}I] a células enteras.

3.2.1) Unión en superficie

Se realizaron varios tipos de ensayos que permitieron determinar la presencia o características propias de los AChRs de superficie. En primer lugar, se realizaron ensayos de saturación empleando células CHO-K1/A5, SHE-P1-h α 7 y SHE-P1-h α 7-Ric-3. Los experimentos de saturación se realizaron exponiendo a las células enteras frente a concentraciones de α -BTX [^{125}I] desde 0 a 100 nM de toxina radioactiva. Se realizaron en paralelo curvas de saturación similares, en las cuales las células se pretrataron con 10 mM de Carb o 10 μM de α -BTX sin marcar, para poder hallar el valor de la unión inespecífica a

cada concentración de α -BTX [125 I]. El *binding* inespecífico hallado en cada punto se sustrajo de la unión de la toxina a las células no pretratadas. Se pudo graficar de esta forma curvas de saturación que correspondieron al *binding* unido específicamente. A partir de estas curvas se realizaron las gráficas de Scatchard para poder determinar con mayor precisión la constante de disociación (K_d) y el máximo número de sitios de unión (B_{MAX}).

Los ensayos cinéticos de asociación con el ligando marcado se realizaron utilizando una concentración fija de α -BTX [125 I] que fue de 40 nM, tomando muestras a distintos tiempos (entre 0 y 30 min). Se evaluó la radioactividad asociada a las células en función del tiempo. Los ensayos cinéticos de recambio del AChR de la membrana celular se efectuaron marcando las células durante 15 min. Posteriormente se lavaron y se procedió a incubarlas por distintos tiempos (0-45 min) a 25°C. Se contó, en este caso, la radioactividad presente en las células y en el medio de cultivo, cuya suma se consideró como el 100%. En todos los casos se realizaron los ensayos de *binding* inespecífico en células pretratadas con nicotina 100 mM o con α -BTX sin marcar (10 μ M).

Para los ensayos de desplazamiento las células CHO-K1/A5 se cultivaron en cápsulas de 35mm hasta 70-80 % de confluencia y luego se resuspendieron con PBS-EDTA. Las células en suspensión se lavaron con *buffer* Ringer de K^+ por centrifugación a 4000 rpm y se suspendieron en un volumen adecuado de este *buffer*. De esta suspensión celular se usaron 150 μ l para cada muestra. A continuación se las incubó en suspensión con concentraciones crecientes de ACh, carbamilcolina, α -BTX, LTG o combinaciones de estas. Cuando los ensayos de desplazamiento de la α -BTX [125 I] se realizaron sobre las células SHE-P1-h α 7 y las SHE-P1-h α 7-Ric-3 (que expresan al receptor neuronal α 7 AChR), éstas se cultivaron en cápsulas de 35 mm hasta 70-80% de confluencia y se las trató de igual forma que las que expresan al receptor muscular de AChR. Luego de resuspenderlas en *buffer* Ringer de K^+ se las incubó en suspensión con concentraciones crecientes de nicotina o de α -BTX.

Luego de la pre-incubación con la droga o drogas en estudio (45 min para el AChR muscular y 10 min para $\alpha 7$ AChR) se las incubó con α -BTX [125 I] durante 1 hora a 25°C a las primeras mientras que sólo 15 min a las segundas. Luego se lavaron 3 veces con *buffer* Ringer de K⁺, mediante sucesivas centrifugaciones a 4000 rpm y finalmente se disolvieron en 400-600 μ l de NaOH 0,1N. La radioactividad remanente se midió en un contador gama con un 80% de eficiencia. El contenido en proteínas de cada muestra se determinó por el método de Lowry (1951) por duplicado en alícuotas de 100 μ l de las muestras.

La unión inespecífica de la toxina radioactiva se determinó por incubación de muestras controles con 1mM de carbamilcolina ó 10 μ M de α -BTX fría durante 45 minutos, en el caso de AChR muscular, mientras que se utilizó 100 mM de nicotina ó 10 μ M de α -BTX fría durante 15 min para el $\alpha 7$ AChR.

3.2.2) Determinación de los sitios totales de unión de α -BTX [125 I]

Para determinar el total de receptores expresados en cada línea clonal y poder cuantificar la relación entre los receptores totales expresados por célula y la fracción de los mismos que se encuentra en membrana, el ensayo de unión con toxina radioactiva se realizó en células permeabilizadas y/o lisadas.

El total de receptores expresados se determinó en células permeabilizadas con 0,5% de saponina. Para lograrlo se retiró el medio de cultivo de cada cápsula, se lavaron las mismas dos veces con *buffer* de K⁺ Ringer y luego se agregó 1 ml de 0,5% de saponina. La misma se retiró inmediatamente y luego de 5 min las células se trataron como se describió para la determinación de receptores en superficie. De esta manera, se puede calcular la fracción de receptores totales con respecto a los expresados en membrana plasmática.

3.3) Ligazón de α -BTX unida a sonda fluorescente

Para el análisis de la expresión de receptores a través de microscopía de fluorescencia, las células se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio circular de 25 mm de diámetro o cuadrados de 18 x18 mm colocados en cápsulas de 35 mm.

3.3.1) Obtención de imágenes

Las imágenes de fluorescencia se capturaron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) o un microscopio Nikon normal modelo Eclipse E-600 T120 equipado con una cámara Apogee K2E de 16 bits refrigerada, controlada a -10°C , SBIG modelo ST-7 (765 x 510 píxeles, $9,0 \times 9,0 \mu\text{m}$ píxeles, Santa Barbara, CA). Este sistema está controlado por el software CCDOPS (SBIG Astronomical Instruments, versión 5.25, Santa Barbara, CA, USA). Se utilizaron objetivos de inmersión 40x (1.0 N.A.) y 60x (1.4 N.A.) para todos los experimentos como también sistemas de filtros adecuados para cada fluoróforo en particular. Las imágenes adquiridas a 16-bit TIFF se analizaron con los programas *Scion Image* o con *Image J* y el armado de las figuras conteniendo distintos paneles se realizó con programa Adobe Photoshop.

3.3.2) Marcación de AChRs expresados en la superficie celular

La marcación de superficie de los AChR musculares o neuronales se logró incubando las células con α -BTX-Alexa Fluor⁴⁸⁸ ó α -BTX-Alexa Fluor⁵⁹⁴ a una concentración final de $1\mu\text{g/ml}$ en el medio de cultivo por 1 hs o 15 min en hielo respectivamente. El exceso de marca se eliminó lavando con medio M1 (140 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, pH 7.4) antes de montar el vidrio y preparar la muestra para su visualización al microscopio.

3.3.3) Marcación intracelular

Para marcar los AChRs intracelulares, se saturaron primero los receptores de superficie por incubación con $1 \mu\text{g/ml}$ de α -BTX o con α -BTX-Alexa Fluor⁴⁸⁸ en medio M1 durante 1 hs en el caso de AChR muscular o 15 min para AChR neuronal. Luego las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 40 min (AChR muscular) o 10 min (AChR neuronal) y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se incubaron con α -BTX-Alexa Fluor⁵⁹⁴ a una concentración final de $1 \mu\text{g/ml}$ en M1 por 1 hora en el caso de AChR muscular o 15 min para el AChR neuronal.

4) Medición de supervivencia celular

Técnica de la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT)

El ensayo de MTT es un método colorimétrico para evaluar viabilidad celular. El MTT de color amarillo es reducido a formazán (violeta) en las mitocondrias de células sanas. Esta reducción sólo tiene lugar en las mitocondrias con enzimas del tipo de las reductasas activas y por lo tanto este parámetro es indicativo del número de células viables. El compuesto de formazán es insoluble y por ende es necesario añadir alcohol isopropílico ácido para obtener una solución coloreada (violeta) que pueda ser medida por el método colorimétrico. La absorbancia de esta solución se mide a 570 nm en un espectrofotómetro.

Para estudiar la viabilidad celular en presencia de LTG, se sembraron las células en placas de 24 pocillos (5×10^4 células/pocillo). Luego de 24 hs se las incubó en presencia o ausencia de LTG por 24 hs determinándose los cambios en viabilidad celular luego del agregado de MTT (1hs a 37°C) y alcohol isopropílico ácido.

5) Preparación de membranas crudas y ricas en AChR de *T. californica*.

Las membranas ricas en AChR se prepararon a partir de tejido de órgano eléctrico de *Torpedo californica* (Gutierrez Merino et al., 1995; Fernández Nievas et al., 2008). Todas las mediciones de fluorescencia en cubeta se realizaron en un fluorímetro SLM modelo 4800, modelo T, usando un rayo de luz polarizado verticalmente de una lámpara Hannovia 200-W mercurio/xenon con un polarizador Glan-Thompson (4-nm de apertura) y cubetas de cuarzo. La temperatura de las suspensiones de membrana se controló mediante un baño de agua circulante con termostato (Haake, Darmstadt, Alemania)

5.1) Medición de fluorescencia de la sonda cristal violeta

La sonda fluorescente cristal violeta (CrV) se disolvió en tres concentraciones stock (10 μ M; 50 μ M; 350 μ M) y se guardó a -20°C para su posterior uso en los experimentos de titulación.

El CrV se agregó a cubetas que contenían membranas ricas en AChR (100µg/mL). Después de cada agregado de CrV, las muestras se incubaron 15 min antes de realizar la obtención del espectro de fluorescencia.

La sonda CrV se excitó a 600nm y la emisión de fluorescencia se registró desde 605 nm hasta 700 nm. Un espectro del fondo ("*background*") se obtuvo excitando las muestras en las condiciones anteriormente mencionadas en ausencia de la sonda CrV. El máximo de fluorescencia de CrV se registró a 623-625 nm. Cuando los experimentos se realizaron en muestras de membranas ricas en AChR en estado desensibilizado, se agregó carbamilcolina (Carb) a una concentración final de 1 mM, incubándose las durante 15 min previos al agregado de la sonda CrV.

5.2) Tratamiento analítico de los registros de fluorescencia

Con la finalidad de determinar las constantes de disociación (K_D) de la sonda CrV, los valores del máximo de emisión fueron puestos en función del logaritmo de la concentración de la sonda (en concentración molar), obteniéndose de esta forma una curva sigmoidea, la cual se ajustó con la función de Boltzmann pudiéndose calcular la K_D .

Con la finalidad de obtener la magnitud de unión de sonda no específica (Lutz y Petersen, 1999) se realizaron experimentos de control con fracciones de membrana de *Torpedo californica* sin AChR.

6) Cuantificación de proteínas

Para determinar el contenido proteico de cada muestra en particular se siguió el método de Lowry y colaboradores (1951). Para ello, las muestras se disolvieron en NaCl 0,1N y se utilizó como estándar seroalbúmina bovina (1 mg/ml), de la cual se tomaron alícuotas de 10, 20, 40, 60, 80, y 100 µL para realizar la curva estandar. A partir de esta curva se calcularon los contenidos de proteínas de las muestras. Cada condición se procesó por duplicado tomándose alícuotas de 100 µL.

7) Análisis estadístico

Todos los datos experimentales se analizaron estadísticamente utilizando el test de Student a dos puntas para detectar las diferencias significativas con la situación control correspondiente.

Capítulo 1

“Bloqueo del receptor nicotínico muscular por el anticonvulsivo Lamotrigina”

Bloqueo del receptor nicotínico muscular por el anticonvulsivo

Lamotrigina.

Antecedentes y objetivos

Diversas drogas tienen la habilidad de modular mediante distintos mecanismos la función de los AChRs. Estas modulaciones pueden involucrar la interacción con el sitio de unión de agonistas, con aminoácidos en la región transmembranal, o con el poro del canal.

La LTG es un anticonvulsivo utilizado principalmente en el tratamiento de epilepsias parciales siendo el bloqueo de canales de sodio (voltaje-dependientes) su principal efecto farmacológico reportado hasta el momento (Leach et al., 1986; Cheung et al., 1992; Lang et al., 1993; Zona y Avoli, 1997).

Dado que los AChRs musculares son canales conductores de sodio y que, según estudios previos, los AChRs neuronales están involucrados en ciertos tipos de epilepsias (Barrantes, 1998) como por ejemplo, la epilepsia nocturna de lóbulo frontal autosómica dominante (ADNFLE), en la que están involucrados los $\alpha 4\beta 2$ AChRs, decidimos estudiar si esta droga afecta, de algún modo, la cinética de activación de los AChRs. Para lograr nuestro objetivo utilizamos como modelo al AChR muscular, por ser el mejor caracterizado de esta familia.

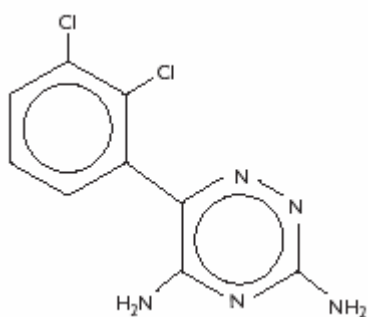


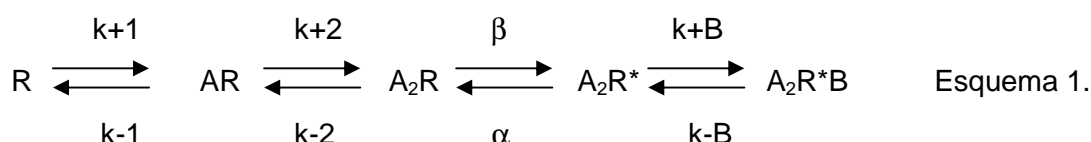
Figura 1.
Estructura química del anticonvulsivo LTG.

Resultados:

1) Caracterización de la activación de los AChRs

Hasta el presente no se ha estudiado la acción del anticonvulsivo LTG sobre el AChR de mamífero. Comenzamos realizando estudios con registros a nivel de canal único en células CHO-K1/A5 que expresan al AChR muscular adulto en forma estable (Roccamo et al., 1999).

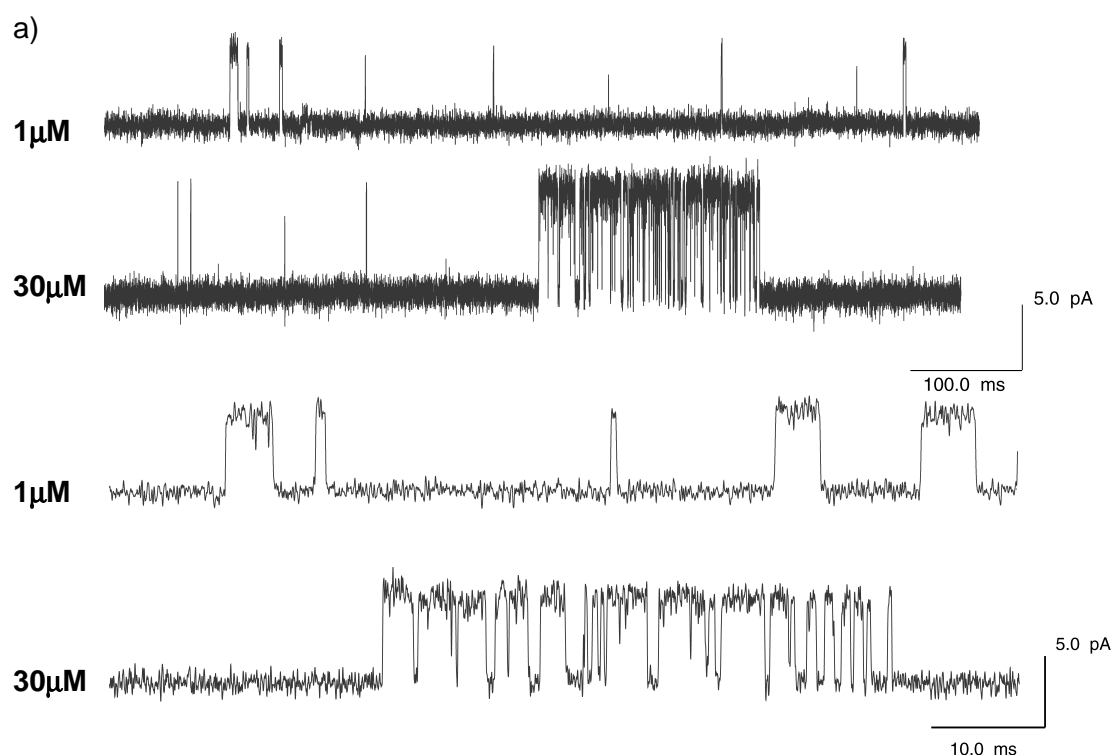
El esquema más simple que describe la activación del AChR muscular es el siguiente (Sine et al., 1990; Salamone et al., 1999):



donde el agonista A, se asocia con el receptor R, con constantes de velocidad k_{+1} y k_{+2} y se disocia con velocidades k_{-1} y k_{-2} . El receptor biligado se abre con velocidad β y se cierra con una velocidad α . La constante de equilibrio de apertura del canal (θ), proviene de la razón entre las velocidades de apertura y cierre del receptor biligado (β/α). En el esquema también se puede apreciar el estado bloqueado A_2R^*B , favorecido a altas concentraciones de agonistas.

A través de estudios electrofisiológicos a nivel de canal único se puede relacionar la activación del AChR muscular con la concentración del agonista. Como se observa en la Figura 2, en presencia de 1 μ M de ACh, el AChR se abre con una duración media de $950 \pm 110 \mu$ s y una amplitud de $5,20 \pm 0,27$ pA, que corresponde al receptor abierto en estado biligado. A esta concentración, el histograma de estados cerrados muestra dos componentes (Figura 2b). Uno de ellos es el componente principal (más largo) cuya duración depende exclusivamente de la cantidad de canales presentes en el sello y

describe los cierres entre episodios de activación de diferentes canales. El otro componente es más breve que el componente principal y corresponde a cierres dentro de un mismo canal (transiciones entre el estado A_2R y A_2R^*). A concentraciones superiores a $10 \mu\text{M}$ de ACh, se pueden observar episodios repetitivos de aperturas y cierres llamados *clusters* (Sakmann et al., 1980; Colquhoun y Ogden, 1988). Un *cluster* comienza cuando un receptor se recupera del estado desensibilizado pasando al estado activo y termina con la nueva desensibilización del mismo. Al aumentar la concentración del agonista, los cierres *intra-clusters* se hacen más breves debido a un aumento en las velocidades de asociación (k_{+1} y k_{+2}) generando un desplazamiento del componente mayoritario del histograma de estados cerrados hacia tiempos más breves (Figura 2). Sin embargo, el tiempo de estado abierto permanece constante para todas las concentraciones del agonista, lo que indica que el gatillado del canal es un proceso independiente de la concentración del agonista.



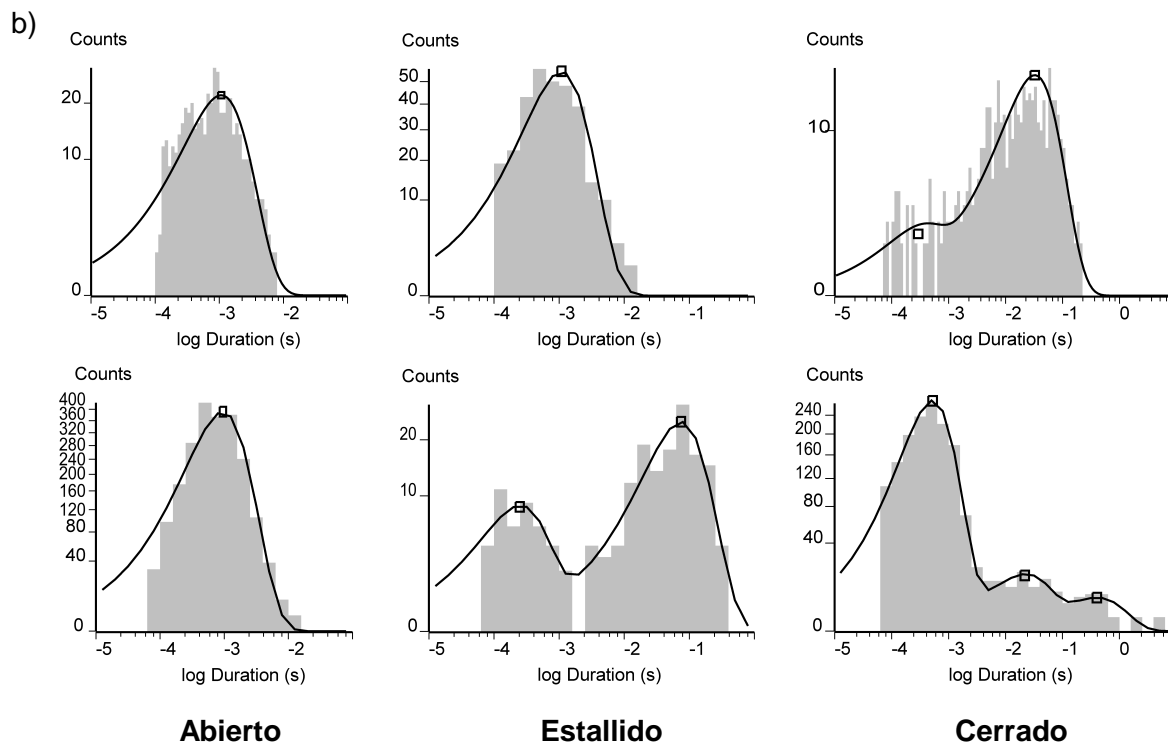


Figura 2.

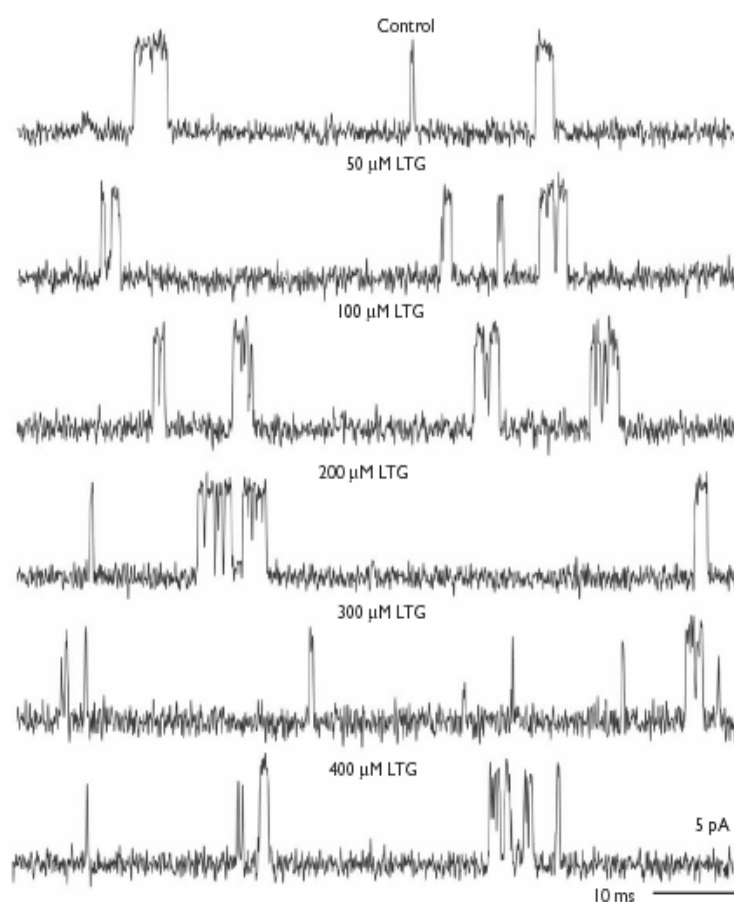
a) Registros del AChR expuesto a 1 y 30 μM de ACh y b) los correspondientes histogramas de tiempo de estado abierto (izquierda), tiempo de estallido (centro) y tiempo de estados cerrados (derecha).

Una serie de eventos de activación repetitivos, precedidos y procedidos por intervalos de cierre más largos que una duración específica se define como tiempo de estallido o "burst". Esta duración corresponde a la intersección entre el componente más breve y el siguiente en los histogramas de tiempo de estado cerrado. Los tiempos de *bursts* brindan información sobre el estado abierto del canal y el estado cerrado inmediatamente adyacente (A_2R^* y A_2R , ver Esquema 1). En los registros obtenidos a 1 μM del agonista endógeno ACh se puede apreciar que el AChR muscular se abre mayoritariamente una vez por episodio de activación, aunque ocasionalmente lo hace dos veces por episodio. Por esta razón, a esta concentración el tiempo de *bursts* es de $1,11 \pm 0,19$ ms.

2) Caracterización de la acción de Lamotrigina sobre el AChR

Cuando expusimos el AChR a una concentración fija de agonista (1 μM de ACh) y concentraciones crecientes de LTG (1-400 μM) lo primero que pudimos apreciar fue que la LTG no alteró ni a 1 ni a 20 μM ningún parámetro cinético del AChR. Sin embargo, entre 50 y 400 μM la LTG produjo una marcada reducción en el tiempo de estado abierto del canal (Figura 3).

a)



b)

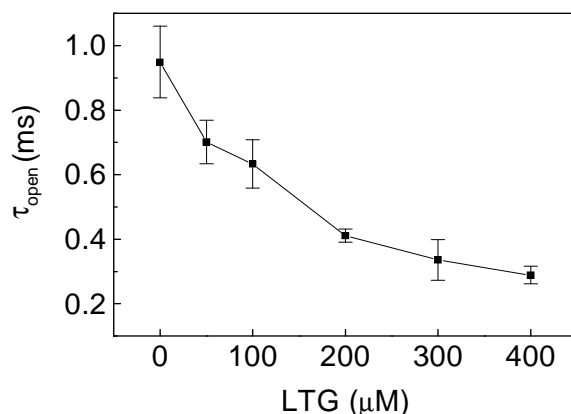
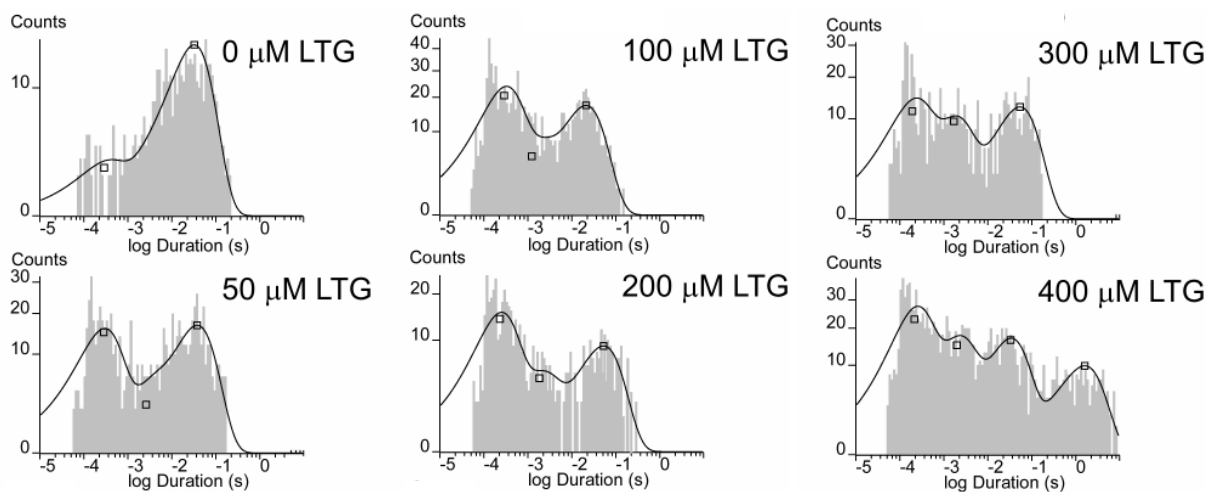


Figura 3.

AChRs musculares activados por ACh en presencia de distintas concentraciones de LTG. a) Los AChRs abiertos se muestran como deflexiones hacia arriba a -70 mV. b) El tiempo de apertura (τ_{open}) del canal (ms) activado con $1\mu\text{M}$ de ACh se muestra en función de la concentración de LTG (μM).

A continuación analizamos si esta reducción en el tiempo de estado abierto del canal (τ_{open}) podía ser consecuencia de un posible bloqueo del AChR por LTG. Estudiamos entonces si se producían cambios en la distribución de los tiempos de estado cerrado de los AChRs luego de ser activados por $1\mu\text{M}$ de ACh en presencia de LTG (50-400 μM). La coaplicación de LTG y ACh cambió significativamente la distribución de los mismos. Más aun, se observó un nuevo componente de aproximadamente 2,0 ms en los histogramas correspondientes a los tiempos de estado cerrado del canal (Figura 4a). La duración de este componente no varió con la concentración de LTG pero su importancia, dada por el área en los histogramas, aumentó en función de ésta (Figura 4b). Por ello asumimos que este nuevo componente de estado cerrado podría estar representando un componente de bloqueo ($\tau_{bloqueo}$) del AChR. Finalmente, se observó un cuarto componente en los histogramas de estado cerrado a la más alta de las concentraciones de LTG utilizadas en este Capítulo (400 μM).

a)



b)

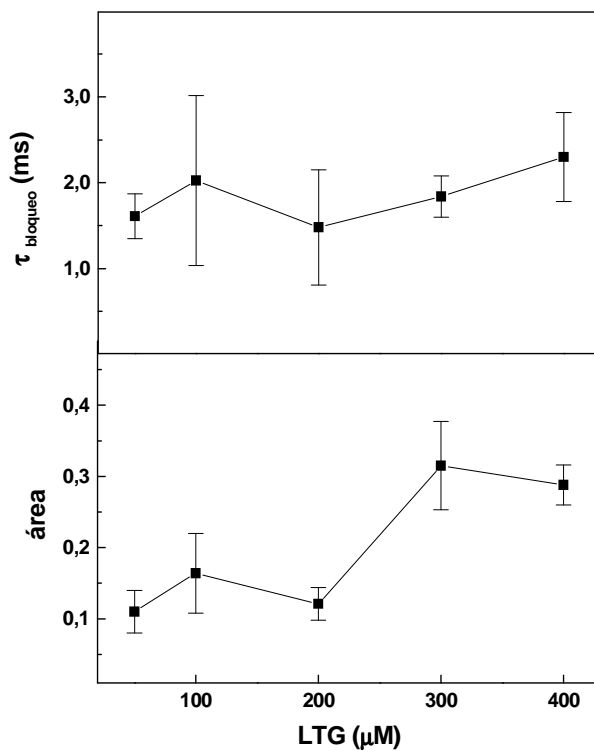
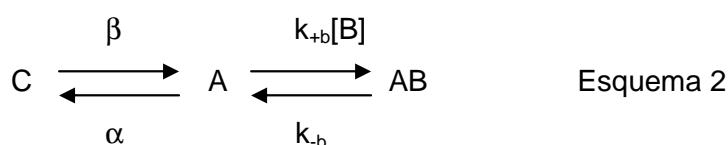


Figura 4.

a) Histogramas de estados cerrados para cada concentración de LTG (μM). Potencial de membrana - 70mV. b) La parte superior de la figura muestra la independencia del τ_{bloqueo} en función de la concentración de LTG (μM), mientras que la parte inferior de la figura ilustra el peso relativo de este componente con respecto a todos los presentes en el histograma de tiempos de estados cerrados del AChR.

2.1) Caracterización a nivel de canal único del bloqueo de los AChRs por Lamotrigina.

En las siguientes secciones, describimos el mecanismo por el cual se produce la inhibición del AChR en presencia de LTG. Dado que la reducción del tiempo de estado abierto del AChR, en forma dependiente de la concentración de una droga, es una conducta típica de bloqueadores de canal abierto (Neher y Steinbach, 1978), estudiamos si esta posibilidad puede ser aplicada al comportamiento de LTG sobre el AChR. Los bloqueadores de canal abierto siguen el siguiente esquema clásico (Adams, 1976 y 1977; Ruff, 1977; Neher y Steinbach, 1978):



en el cual C, A y AB corresponden a los estados cerrados, abiertos y bloqueados respectivamente. Este modelo es seguido por los bloqueadores de canal abierto como QX-222 o efedrina (Neher y Steinbach, 1978; Bouzat, 1996), en los cuales, la molécula bloqueadora se introduce dentro del poro del canal y bloquea transitoriamente el pasaje de iones.

2.1.1) Efecto de la Lamotrigina sobre el tiempo de estado abierto del receptor

Al analizar el tiempo en el cual el canal se encuentra abierto, se puede estimar que será inversamente proporcional a la suma de las velocidades que lo alejan del mismo. Por lo tanto, el tiempo medio de estado abierto (τ_{open}) es igual:

$$\tau_{open} = (\alpha + k_{+b}[B])^{-1} \quad \text{Ecuación 1}$$

Consecuentemente, $1/\tau_{open}$ arroja una relación lineal. En esta ecuación, k_{+b} representa la constante de bloqueo para [B] y α la velocidad aparente de cierre del canal. Aplicando la

inversa de la ecuación 1 (Figura 5), a los datos obtenidos de las corrientes generadas por el AChR en presencia de $1\mu\text{M}$ de ACh y de LTG ($50\text{-}400\mu\text{M}$) se calculó el valor de $k_{+b}[\text{LTG}]$ a partir de la pendiente de la curva, en $6,2 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

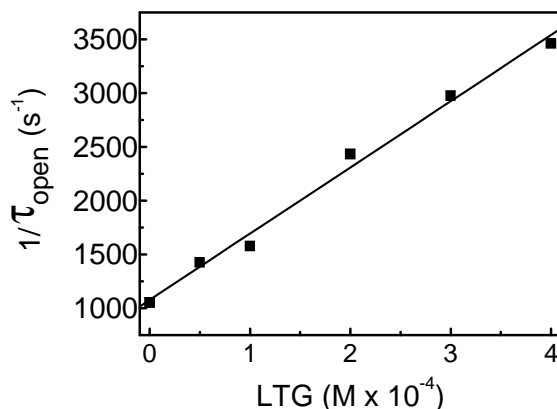


Figura 5.

Inversa del tiempo de apertura del canal en función de la concentración de LTG.

Este valor está dentro de los valores de k_{+b} encontrados para otros bloqueadores de canal abierto como pentobarbital: $6,5 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Dilger et al., 1997); efedrina: $2,8 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Bouzat, 1996); MK-801: $2 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Amador y Dani, 1991) y QX-222: $2,0 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Neher y Steinbach, 1978). El valor de α puede calcularse de la ecuación 1 para valores de $\text{LTG} = 0 \mu\text{M}$, lo que da un valor de $\alpha = 1086 \text{s}^{-1}$.

2.1.2) Efecto de la Lamotrigina sobre el tiempo de estado cerrado del receptor

Como se mencionó previamente, en los histogramas de tiempo de estado cerrado de los AChRs expuestos a LTG ($50\text{-}400\mu\text{M}$) y ACh ($1\mu\text{M}$) se detectó la presencia de un nuevo componente. A partir de su duración $\sim 2 \text{ms}$ ($1/k_{-b}$ en el Esquema 2), se pudo calcular la constante de desbloqueo del canal (k_{-b}) en 575s^{-1} .

También calculamos la constante de disociación aparente para el proceso de bloqueo (K_b), como la razón entre k_{-b} y $k_{+b}[\text{B}]$ obteniéndose un valor de $92,7 \mu\text{M}$ al potencial de membrana aplicado en nuestros experimentos (-70mV).

A continuación analizamos la duración del tiempo de bloqueo en función del potencial de membrana aplicado (Figura 6a). Se detectó que el τ_{bloqueo} aumentó a medida que los potenciales de membrana se hacían más negativos, indicando que el bloqueo por LTG es dependiente del voltaje aplicado.

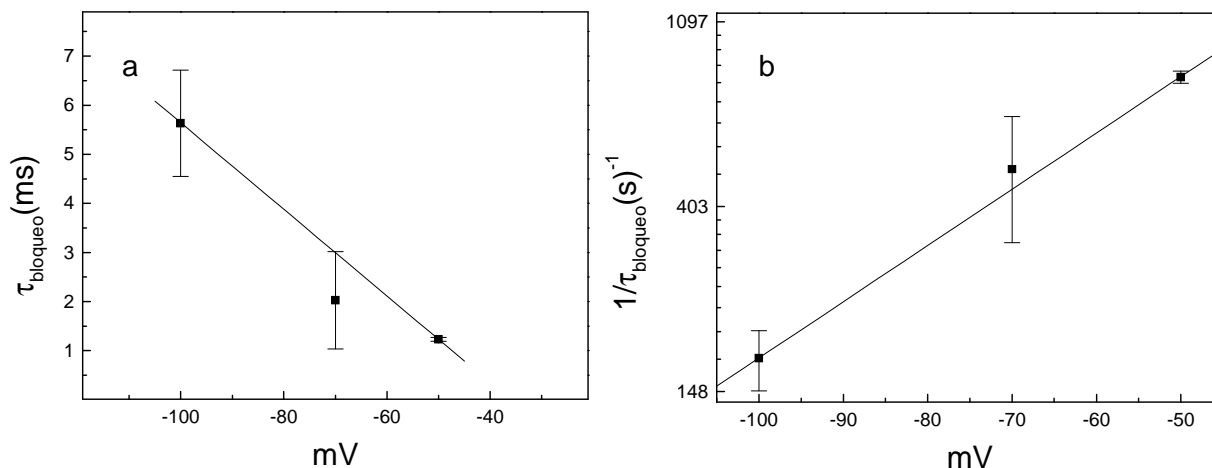


Figura 6.

Caracterización del bloqueo por LTG. a) Se grafica la duración del tiempo de bloqueo y b) la velocidad de desbloqueo en función del potencial de membrana aplicado.

La dependencia al voltaje de la velocidad de desbloqueo (k_{-b}), la determinamos mediante la regresión lineal de los valores experimentales en un gráfico logarítmico (Figura 6b) donde:

$$\ln [k_{-b} (V)] = \ln [t_{\text{bloqueo}}(V)]^{-1} = 8,22501 + 0,03045 \times V$$

V está expresado en mV y k_{-b} en s^{-1} . De esto resulta:

$$k_{-b} (V) = [t_{\text{bloqueo}}(V)]^{-1} = 3733,15 \times e^{(0,03045 \times V)} = 3733,15 \times e^{(V/32,8)}$$

Esto nos permite determinar que el tiempo de bloqueo cambia e veces cada 32,8 mV lo que estaría indicando una fuerte dependencia del voltaje en el proceso de desbloqueo.

2.1.3) Efecto de la Lamotrigina sobre el tiempo de estallido del receptor

El estudio de los tiempos de los estallidos (τ_{burst}) también contribuye a caracterizar la acción bloqueante de un compuesto. Basándonos en el Esquema 2, si el bloqueador se disocia rápidamente del canal, se esperaría que las aperturas ocurriesen en estallidos debido a que éste se bloquea y desbloquea varias veces antes de cerrarse (Colquhoun y Hawkes, 1983). Los estallidos representan una serie de eventos de aperturas de un AChR separadas por un tiempo crítico de cierre. Para el presente trabajo se definió este tiempo crítico como la intersección entre los dos componentes de los histogramas de tiempo de estado cerrado de los AChRs (ver Materiales y Métodos). Cabe resaltar que en los registros se observaron aperturas seguidas de cierres breves. Este fenómeno conocido como *flickering* se produce cuando un bloqueador sigue el Esquema 2. El *flickering* producido en presencia de LTG puede observarse en la Figura 3a.

Al exponer los AChRs a 1 μ M de ACh y LTG (50-400 μ M) se pudo apreciar la aparición de un nuevo componente de τ_{burst} (Figura 7). Este último τ_{burst} o $\tau_{burst 2}$ incrementó su duración en función de la concentración de LTG aplicada. El componente de τ_{burst} original o $\tau_{burst 1}$, tuvo una duración similar al τ_{open} , lo cual seguramente refleja aperturas individuales del AChR, mientras que $\tau_{burst 2}$, más largo en duración, probablemente refleja aperturas seguidas por interrupciones breves del canal (Figura 7). Este comportamiento es esperable para un bloqueador de canal abierto ya que el bloqueo ocasionado por la LTG, provoca la transición entre los estados A y AB (Esquema 2).

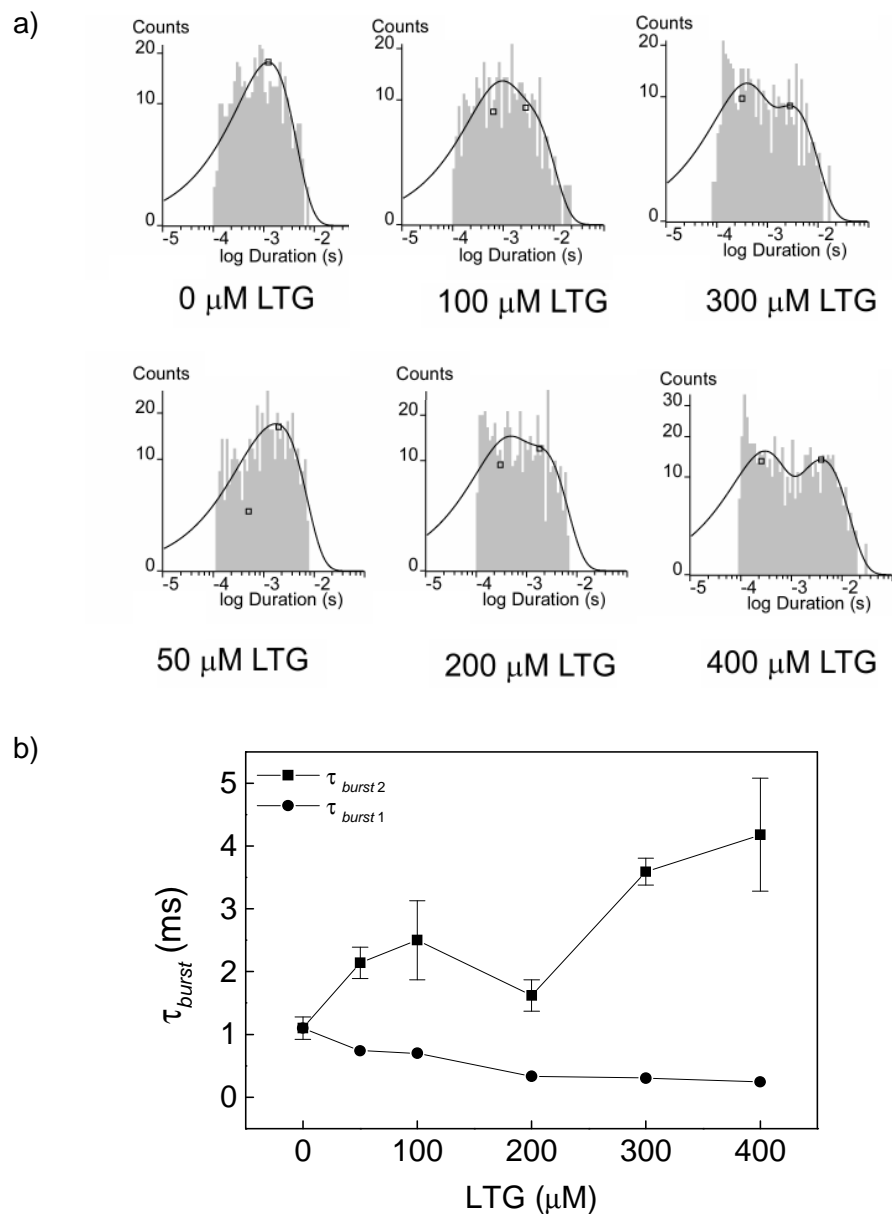


Figura 7.

a) Histogramas de los estados de *bursts* para cada concentración de LTG (μM). Potencial de membrana, -70mV . b) Relación entre el tiempo de *burst* y la concentración de LTG (μM).

También se calculó el número de aperturas por *bursts* ($N_{\text{aperturas}/\text{bursts}}$) a partir de la siguiente ecuación:

$$N_{\text{aperturas}/\text{bursts}} = (\alpha + k_{+b} [B]) / \alpha \quad \text{Ecuación 2}$$

Al graficar el $N_{\text{aperturas}/\text{bursts}}$ en función de la concentración de LTG observamos un aumento en forma lineal de este parámetro con el incremento de la concentración del

anticonvulsivo (Figura 8). A demás, del análisis de regresión lineal pudimos estimar el valor de k_{+b}/α en $8351,56 \text{ M}^{-1}$ como el valor de la pendiente de la curva.

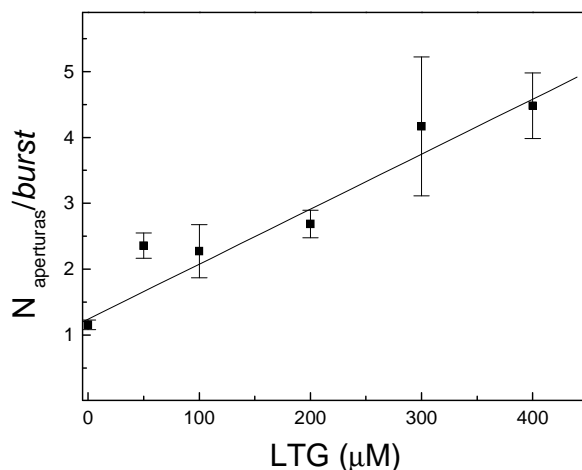


Figura 8.

El Número de aperturas por *bursts* ($N_{\text{aperturas}}/\text{bursts}$) aumenta en forma lineal con la concentración de LTG (μM).

Dado que por definición el τ_{apertura} por *burst* es igual a:

$$\tau_{\text{apertura}} \times N_{\text{aperturas}}/\text{burst} = (1/\alpha + k_{+b}[\text{B}]) \times [(\alpha + k_{+b} [\text{B}]) / \alpha]$$

entonces el tiempo total de apertura por *burst* debería ser igual al tiempo de apertura en ausencia del bloqueador:

$$\tau_{\text{apertura}} \times N_{\text{aperturas}}/\text{burst} = 1/\alpha \quad \text{para } [\text{B}] = 0 \mu\text{M}$$

Podemos entonces calcular el valor de α y así obtener un valor para k_{+b} en $7,61 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Este valor es muy cercano al valor obtenido a partir de los datos de la Figura 5.

2.1.4) Efecto de la Lamotrigina sobre la amplitud de las corrientes del AChR

Por último se analizó la corriente generada por el AChR tras ser activado por ACh ($1\mu\text{M}$) en presencia de LTG ($50\text{-}400 \mu\text{M}$). Se pudo observar una leve disminución de la misma al incrementar la concentración de LTG (Figura 9). Aunque este modelo (Esquema 2) no

predice cambios en la corriente del AChR, una disminución aparente de la misma puede deberse a un rápido bloqueo del canal.

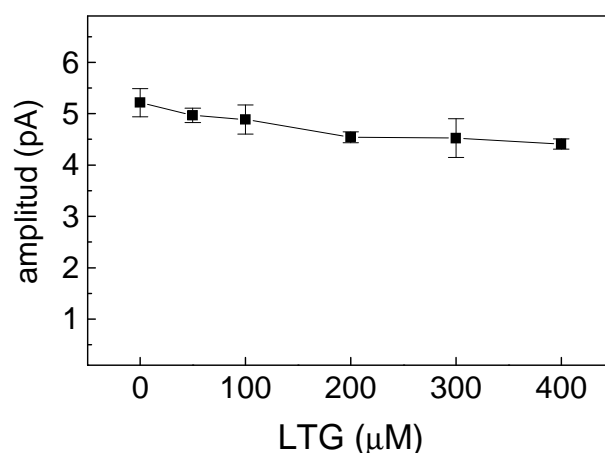


Figura 9.

Relación entre la amplitud de las corrientes generadas por ACh (1 μM) en función de la concentración de LTG (μM).

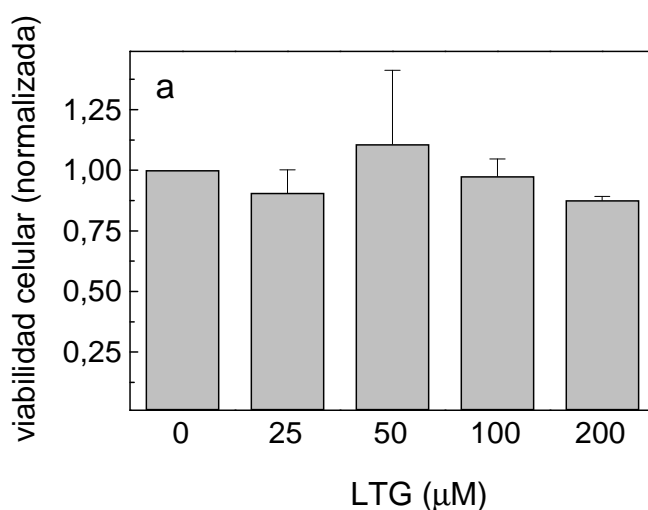
3) Estudio de la viabilidad de las células tratadas con LTG

Bajo condiciones terapéuticas, la concentración de LTG en plasma y en líquido cerebroespinal se encuentra en el rango de 10-40 μM aunque se han detectado valores por encima de 100 μM en casos de sobredosis (Beran et al., 1994). Dado que las concentraciones de LTG utilizadas en este trabajo de Tesis son similares a las encontradas en los fluidos corporales de personas en tratamiento, quisimos estudiar si las células CHO-K1/A5 luego de ser expuestas a la LTG mostraban alguna modificación en su morfología o en su viabilidad.

Comenzamos observando si se produce alguna modificación en la morfología de las células CHO-K1/A5 luego de incubarlas durante 24 hs en presencia de diferentes concentraciones de LTG (25-200 μM) usando como control células CHO-K1/A5 incubadas en medio de cultivo sin el agregado de LTG. En estas condiciones, no observamos ninguna modificación en el aspecto de las células con respecto a la situación control (datos no mostrados).

Como se describe en Materiales y Métodos, se utilizó el ensayo de MTT para evaluar viabilidad celular. El MTT, de color amarillo, es reducido por las mitocondrias de las células sanas a formazán, de color violeta. Éste se solubiliza con el agregado de alcohol isopropílico ácido y se puede realizar una cuantificación de las células viables midiendo la absorbancia de esta solución a 570 nm en un espectrofotómetro. Las medidas de absorbancia fueron normalizadas con respecto a la condición control en cada caso.

A continuación se incubaron las células CHO-K1/A5 en ausencia (control) y presencia de diferentes concentraciones de LTG (25-200 μM) durante 24 hs y luego se les realizó el ensayo de MTT (Figura 11a). Las células expuestas a la LTG, no vieron afectada su viabilidad celular con respecto a las células control. Seguidamente, se quiso estudiar si la LTG ejercía algún efecto frente a un estímulo nocivo como es la privación de suero en el medio de cultivo durante 24 hs (Figura 11b). En ausencia de suero, la viabilidad celular disminuyó en un 15% (controles, $p < 0,001$). Sin embargo, cuando las células se incubaron bajo estas mismas condiciones pero en presencia de LTG (50 μM) este parámetro no se vio afectado (Figura 11b).



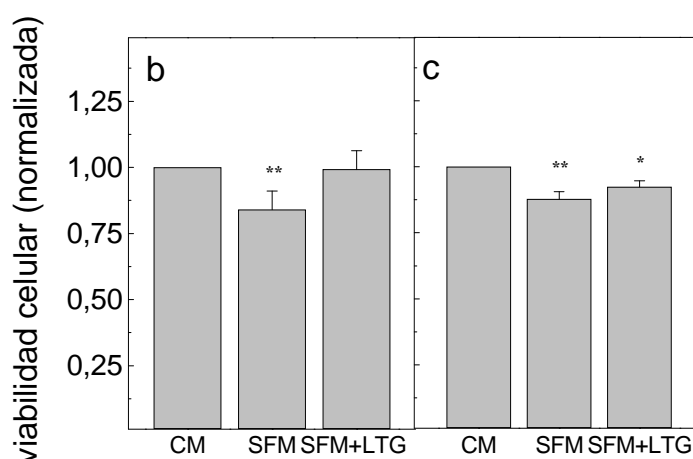


Figura 11.

a) Valores de viabilidad celular obtenidos para células CHO-K1/A5 tratadas con la LTG durante 24 hs en medio completo. La primera columna representa la condición control. La concentración de LTG (μM) se muestra en cada barra. b) Muestra el efecto de la LTG sobre las células CHO-K1/A5 y c) sobre la línea parental CHO-K1. CM es la condición control (células en medio completo); SFM corresponde a las células privadas de suero; SFM + LTG corresponde a las células privadas de suero en presencia de 50 μM LTG. Los datos están representados por el promedio de mediciones de viabilidad \pm desvío estándar de por lo menos tres muestras en cada condición. * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$, con respecto a la condición control.

Se repitieron estos experimentos sobre la línea celular parental CHO-K1 a fin de determinar si el efecto observado en las células CHO-K1/A5 involucra al AChR. Cabe resaltar que la diferencia entre estas dos líneas celulares es que las CHO-K1/A5 (Roccamo et al., 1999) expresan heterológamente al AChR muscular adulto, mientras que las CHO-K1 no lo hacen. Las células CHO-K1 al igual que las CHO-K1/A5 fueron sensibles a las privación de suero por 24 hs, determinado por el ensayo de MTT (Figura 11c). Llamativamente, la incubación de estas células con LTG (50 μM) durante 24 hs en ausencia de suero no produjo protección detectable, lo que fuertemente sugiere que la expresión de los AChRs estaría involucrada en la protección ejercida por LTG frente a la privación de suero (Figura 11c).

Discusión

Los AChRs se ven afectados por una amplia variedad de compuestos farmacológicos llamados inhibidores no competitivos (INC). Estos varían en sus estructuras como también en sus propiedades fisicoquímicas, lo cual determina que los mecanismos por los cuales actúan sobre los AChR son diversos. Existen tres mecanismos básicos para inhibir el paso de iones por el poro del canal de los receptores: 1) bloqueo estérico (Neher y Steinbach, 1978), 2) inhibición alostérica (Dilger y Brett, 1991; Bouzat y Barrantes, 1996); y 3) modificación de la velocidad de desensibilización (Boyd y Cohen, 1984). El objetivo del trabajo desarrollado en este capítulo consistió en determinar si existe alguna interacción entre el anticonvulsivo LTG y el AChR.

La comparación entre la cinética del AChR muscular activado por ACh, su ligando natural, y la misma en presencia de concentraciones crecientes (50-400 μM) de LTG, nos permitió caracterizar a la LTG como un INC del AChR dado que en estas condiciones:

- a) El tiempo de apertura del canal disminuyó en función de la concentración aplicada de LTG.
- b) La duración de los períodos de bloqueo fue independiente de la concentración aplicada de LTG.
- c) Se produjo un aumento en el área relativa del componente de bloqueo en los histogramas de estados cerrados.
- d) La duración de los *bursts* aumentó a medida que lo hizo la concentración aplicada de LTG.
- e) La amplitud de las corrientes analizadas en presencia de LTG (100-400 μM) disminuyó al incrementar la concentración de la droga.

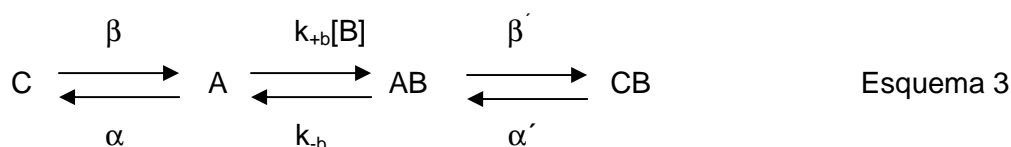
Al notar estos cambios en la cinética del canal en presencia del anticonvulsivo quisimos aplicar un modelo que se ajustara a estas condiciones. El modelo más simple de bloqueo de

un canal es el propuesto por Neher y Steinbach (1978) en el cual la molécula bloqueadora se introduce en el poro del canal y bloquea transitoriamente el pasaje de iones (Esquema 2). Si el bloqueador se disocia rápidamente se espera que las aperturas ocurran en estallido debido a que el canal se bloquea y desbloquea varias veces antes de cerrarse (Colquhoun y Hawkes, 1983). Por lo tanto si la LTG siguiese este modelo se esperaría ver:

- 1) reducción en el τ_{open} en función de la concentración de la molécula bloqueadora.
- 2) aumento del área del componente más breve del histograma de tiempo de estado cerrado τ_{close1} en función de la concentración de la molécula bloqueadora.
- 3) surgimiento de un nuevo componente de tiempo de estado cerrado que represente el $\tau_{bloqueo}$.
- 4) prolongación del tiempo de estallido del canal τ_{burst} en función de la concentración de la molécula bloqueadora.
- 5) que la amplitud de la corriente generada por el canal no se modifique.

La aplicación de LTG (50-400 μM) en presencia del agonista cumplió a excepción del último punto, con todos los cambios esperados por este modelo. Sin embargo, la disminución aparente de la amplitud de las corrientes observada en presencia de LTG puede deberse al rápido bloqueo del canal por LTG aunque esta no sea una característica predecida por este modelo (Dilger y Brett, 1991).

Diliger y Brett (1991) presentaron un modelo alternativo (Esquema 3) para moléculas bloqueadoras de canal abierto donde se incorpora el estado CB, que corresponde al estado cerrado bloqueado:

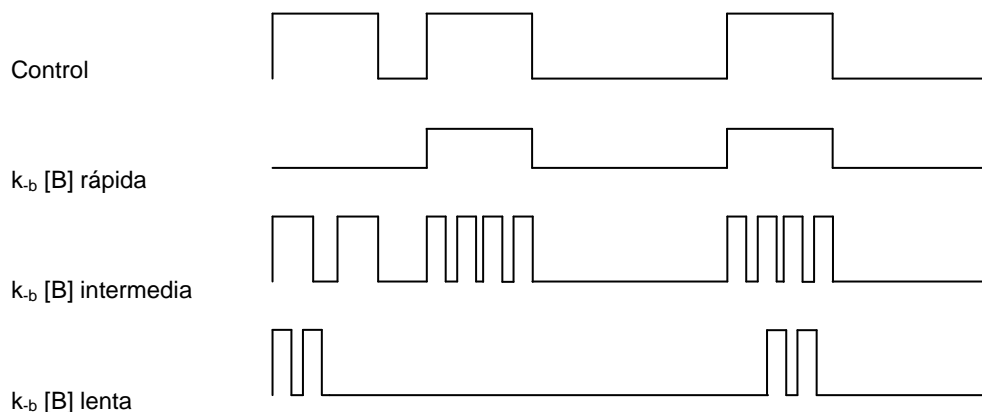


Si el compuesto bloqueador siguiese este esquema también se esperaría ver una reducción en el τ_{open} en función de la concentración de la molécula bloqueadora. Sin embargo, este modelo predice que la duración de los τ_{burst} debe disminuir en función de la concentración de la molécula bloqueadora dado que el receptor tiene la posibilidad de pasar directamente a un estado cerrado del canal. Como se mencionó previamente, la presencia de LTG aumentó la duración de los τ_{burst} en función de la concentración aplicada. Por lo tanto el modelo presentado en el Esquema 2 es el que mejor se ajusta con nuestros resultados.

A partir del análisis de los registros electrofisiológicos obtenidos pudimos calcular la constante de bloqueo k_{+b} [LTG] en $6,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor es muy similar al calculado para otros bloqueadores de canal abierto como hexanol: $2,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, isoflurano: $1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, enflurano: $1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Dilger y Brett, 1991), pentobarbital: $6,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Dilger et al., 1997), efedrina $2,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Bouzat, 1996), MK-801: $2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Amador y Dani, 1991) y QX-222: $2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Neher y Steinbach, 1978) entre otros.

También calculamos la constante de desbloqueo para LTG, k_{-b} [LTG]. Este valor representa la velocidad de desbloqueo del canal y por lo tanto es reflejo de la apariencia que tiene el canal en presencia del bloqueador. Para compuestos con una k_{-b} [B] muy rápida como el butanol (20000 s^{-1}), al ser tan alta la velocidad de desbloqueo, la mayoría de los eventos individuales de bloqueo no son detectados y sólo se observa una disminución en la amplitud de los canales. Para compuestos con una k_{-b} [B] muy lenta como el decanol (100 s^{-1}) es tan lenta la disociación del receptor que el decanol permanece unido al canal y consecuentemente esto se ve como si el mismo estuviese más tiempo en el estado cerrado. Finalmente los compuestos con una k_{-b} [B] intermedia como el octanol (480 s^{-1}) o el hexanol (1500 s^{-1}) presentan una velocidad de disociación adecuada para poder observar el fenómeno de *flickering*, es decir, las pequeñas transiciones entre los estados abierto y bloqueado. La k_{-b} [LTG] se calculó en 575 s^{-1} lo que coincide con el aspecto esperado para

los canales activados por ACh en presencia del anticonvulsivo a esta velocidad de desbloqueo (Figura 3a).



Esquema que representa el aspecto de los canales en función de la velocidad de desbloqueo k_b [B].

La constante de disociación aparente para el proceso de bloqueo (K_b) se calculó a partir de la razón entre k_b y k_{+b} [B] en $\sim 93 \mu\text{M}$. Este valor es similar al reportado para epibatidina $\sim 100 \mu\text{M}$ (Prince y Sine, 1998), octanol $\sim 15 \mu\text{M}$ y hexanol $\sim 620 \mu\text{M}$, otros bloqueadores de canal abierto.

La dependencia al voltaje del tiempo de bloqueo (τ_{bloqueo}) es otro parámetro a tener en cuenta para la caracterización de los bloqueadores de canal abierto. En este capítulo calculamos que la velocidad de desbloqueo cambia e veces cada $\sim 33 \text{ mV}$. Este valor es similar al reportado para el bloqueador QX-222, $\sim 59 \text{ mV}$ (Neher y Steinbach, 1978). Creemos que una molécula sola de LTG parecería estar involucrada en el bloqueo del canal ya que la duración del estado “bloqueado” no aumentó con la concentración de LTG, en contraposición con informes anteriores sobre la acción de otro bloqueador de canal abierto del AChR muscular como la tacrina (Prince et al., 2002).

Cabe resaltar que las modificaciones observadas en la cinética del AChR a $50 \mu\text{M}$ de LTG y acentuadas a concentraciones superiores del anticonvulsivo se corresponden con los

niveles de LTG hallados en los fluidos corporales de personas en tratamiento. Por ello decidimos estudiar si se veía afectada la viabilidad en las células expuestas a LTG. Observamos que,

- a) la viabilidad celular no se vio afectada por la presencia de la LTG (25-200 μM).
- b) Frente a la privación de suero por 24 hs, la viabilidad de las células CHO-K1/A5 disminuyó significativamente ($p < 0,001$), pero que en presencia de LTG 50 μM , este compuesto compensó los efectos nocivos de la privación de suero.
- c) Frente a la privación de suero por 24 hs, la viabilidad de las células CHO-K1 disminuyó significativamente ($p < 0,001$) y en este caso la presencia de LTG 50 μM no compensó los efectos nocivos de la privación de suero.

Estudios recientes indican que la LTG (1-50 μM) puede inhibir los daños producidos en las mitocondrias y la muerte celular inducida por los inhibidores del *complejo I* de la cadena transportadora de electrones, rotenona y 1-metil-4 fenilpiridinio (MPP+) en células PC12 (Kim et al., 2007). Estas drogas reducen la viabilidad celular en forma similar a la producida por la neurotoxicidad parkinsoniana. Al inhibir al *complejo I* de la cadena transportadora de electrones, se produce un exceso de especies oxígeno reactivas (ROS) que actúan aumentando la permeabilidad de la membrana mitocondrial, con la consecuente muerte celular. Las ROS actúan también relocalizando a BAX desde el citosol hacia la membrana mitocondrial, participando en la liberación de citocromo c y activando caspasas (Kim et al., 2007). Los autores de este estudio concluyen que la LTG podría ejercer su acción protectora inhibiendo la formación de ROS.

Otro estudio demuestra que la protección de la LTG frente a MPP+ no se produce por la activación del catabolismo de esta última ya que LTG no interactúa con la monoaminaoxidasa B (Southam et al., 2005) ni con el citocromo P450 (Anderson, 1998). Sin embargo existen estudios (Loschmann et al., 1995) que demuestran que la LTG no protege de la toxicidad inducida por 6-hidroxidopamina, la neurotoxina más ampliamente utilizada en

el desarrollo de modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson en roedores, que también posee una potente acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial, con la consecuente muerte neuronal ligada fundamentalmente a la formación de H_2O_2 , radicales libres tipo hidroxilo (OH^\cdot) y quinonas que se producen en su metabolización. Por lo tanto, hasta ahora no ha sido esclarecido cuál es el mecanismo por el cual la LTG protege a las células.

En nuestro trabajo observamos que los AChRs estarían involucrados en el efecto protector frente a la reducción de la viabilidad celular provocada por la privación de suero en presencia de LTG. Surge naturalmente la pregunta de cómo en ausencia de un agonista (que abra el canal) un bloqueador de canal abierto pueda influir sobre la actividad del AChR. Es importante destacar que la probabilidad de apertura del AChR en ausencia de agonista es muy baja (Jackson, 1984).

Estudios recientes han mostrado que la nicotina protege a las células SHSY-5Y, que expresan al receptor neuronal $\alpha 7$ AChR, de la toxicidad inducida por Salsolinol (1-metil-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina), un metabolito de la dopamina, ejerciendo efectos antiapoptóticos directamente a través del $\alpha 7$ AChR (Copeland et al., 2007). Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue tratar de dilucidar qué otro tipo de interacción se produce entre la LTG y el AChR, ya que un simple bloqueo de canal no puede ser el responsable de los efectos observados sobre la viabilidad celular.

Capítulo 2

“Activación del receptor nicotínico muscular por el anticonvulsivo Lamotrigina”

Activación del receptor nicotínico muscular por el anticonvulsivo

Lamotrigina

Antecedentes y objetivos

En el Capítulo anterior estudiamos la acción de la Lamotrigina sobre los AChRs en presencia del agonista natural, la ACh. A continuación, estudiamos si la LTG tiene efectos directos sobre el AChR, en ausencia de ACh.

Resultados

1) Caracterización de la acción de la LTG sobre el AChR

Para responder esta pregunta, expusimos a los AChRs expresados en las células CHO-K1/A5 a un amplio rango de concentraciones de LTG (0,05-400 μM) utilizando nuevamente la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* en la configuración célula adherida (Figura 1). De esta manera comprobamos que la LTG era capaz de activar a los AChRs en ausencia de su agonista natural, la ACh.

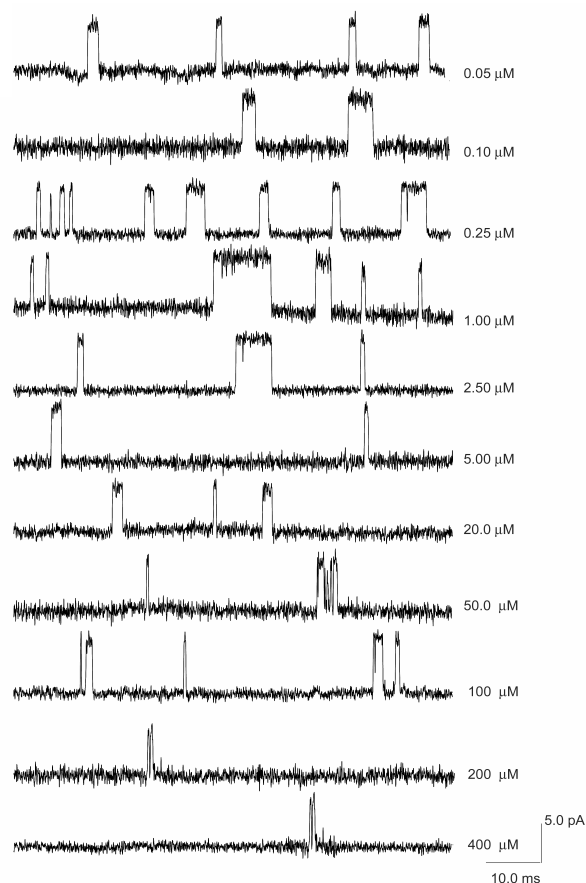


Figura 1.
Registros de las corrientes del AChR a nivel de canal único generadas por la exposición a las concentraciones indicadas de LTG (μM).

1.1) Caracterización de la activación de los AChRs por LTG

En las siguientes secciones estudiamos los distintos parámetros cinéticos del receptor tras ser activado por LTG.

1.1.1) Caracterización del tiempo de estado abierto de los AChRs activados por LTG.

Comenzamos analizando la duración del tiempo durante el cual el canal permanece abierto (τ_{open}) luego de ser activado por el anticonvulsivo (Figura 2 y Tabla 1). Observamos que a las concentraciones de LTG más bajas usadas (0,05-5 μM) el τ_{open} no varió significativamente mientras que a concentraciones superiores a 20 μM se produjo una disminución de este parámetro.

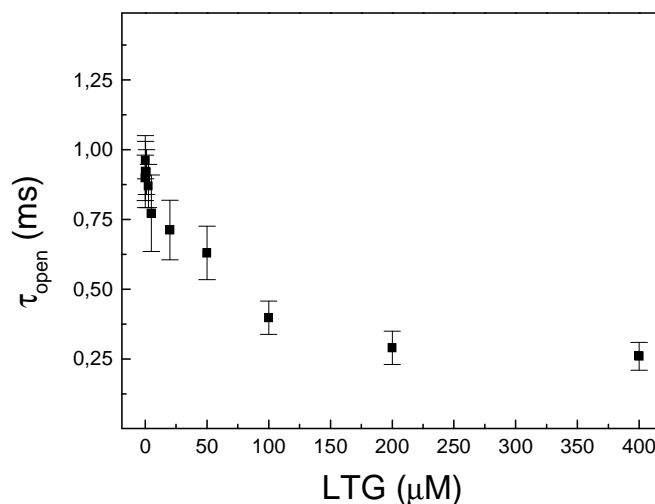


Figura 2.

Dependencia del tiempo de estado abierto de los AChRs en función de la concentración indicada de LTG (μM).

LTG (μM)	τ_{open} (ms)	D.E. (ms)
0,05 (n=3)	0,899	0,081
0,10 (n=5)	0,922	0,129
0,25 (n=3)	0,963	0,067
1,00 (n=6)	0,920	0,080
2,50 (n=4)	0,870	0,077
5,00 (n=3)	0,772	0,137
20,0 (n=4)	0,712*	0,107
50,0 (n=5)	0,630**	0,096
100 (n=6)	0,398**	0,060
200 (n=3)	0,290**	0,060
400 (n=3)	0,260**	0,050

Tabla 1.

Variación del tiempo de estado abierto de los AChRs activados por LTG. Los datos están representados por el promedio de mediciones de $\tau_{\text{open}} \pm$ desvío estandar (D.E.) de por lo menos tres muestras en cada condición.* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ con respecto al τ_{open} a $0,05 \mu\text{M}$ de LTG.

1.1.2) Caracterización de los tiempos de estado cerrado de los AChRs activados por LTG

A continuación analizamos el tiempo y la distribución de los estados cerrados del AChR activado por LTG. Los histogramas de cierre (Figura 3) presentaron dos componentes principales hasta $20 \mu\text{M}$ de LTG. A partir de $50 \mu\text{M}$ de LTG se comenzó a ver un tercer componente de $\sim 1,50$ ms de duración, el que permaneció constante desde 50 a $400 \mu\text{M}$ aunque no así su área en los histogramas. Esta se incrementó en función de la concentración de LTG aplicada en el sello. Por último, se pudo apreciar un cuarto componente a las concentraciones más altas utilizadas en este estudio (200 y $400 \mu\text{M}$) el

cual muy probablemente se deba a la desensibilización producida por estas concentraciones de la droga (Cachelin et al., 1989).

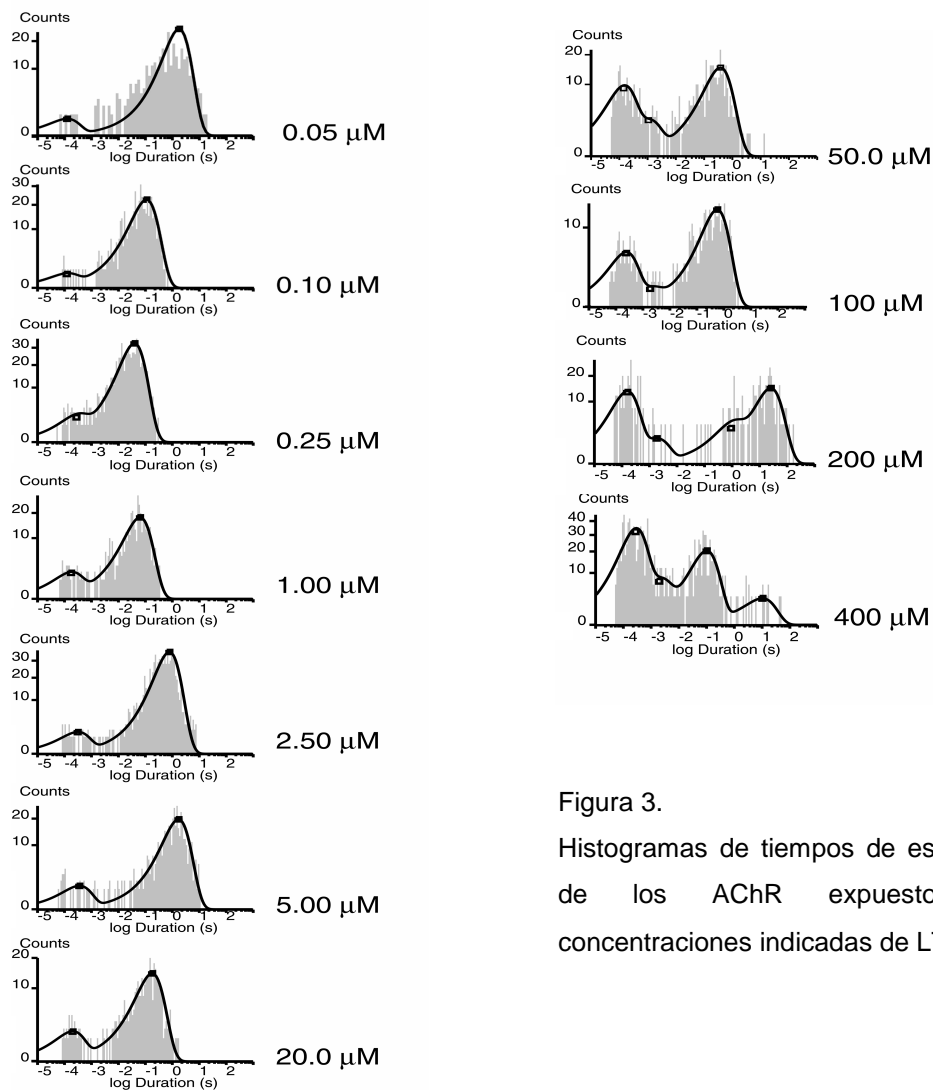


Figura 3.
Histogramas de tiempos de estado cerrado de los AChR expuestos a las concentraciones indicadas de LTG (μM).

1.1.3) Caracterización de los tiempos de estallido de los AChRs activados por LTG

Se realizó el análisis de los tiempos de estallido del AChR activados por LTG como se describe en Materiales y Métodos (Figura 4). De esta manera pudimos ajustar con un único componente al τ_{burst} para concentraciones de LTG entre 0,05 y 1,00 μM de LTG. A partir de 2,5 μM de LTG los histogramas de tiempo de estallido debieron ser ajustados con dos componentes. El más breve τ_{burst1} con duración similar al tiempo de apertura de los eventos individuales, mientras que el más largo, τ_{burst2} , de aproximadamente 2 ms, posiblemente responda a la existencia de más de una apertura por episodio.

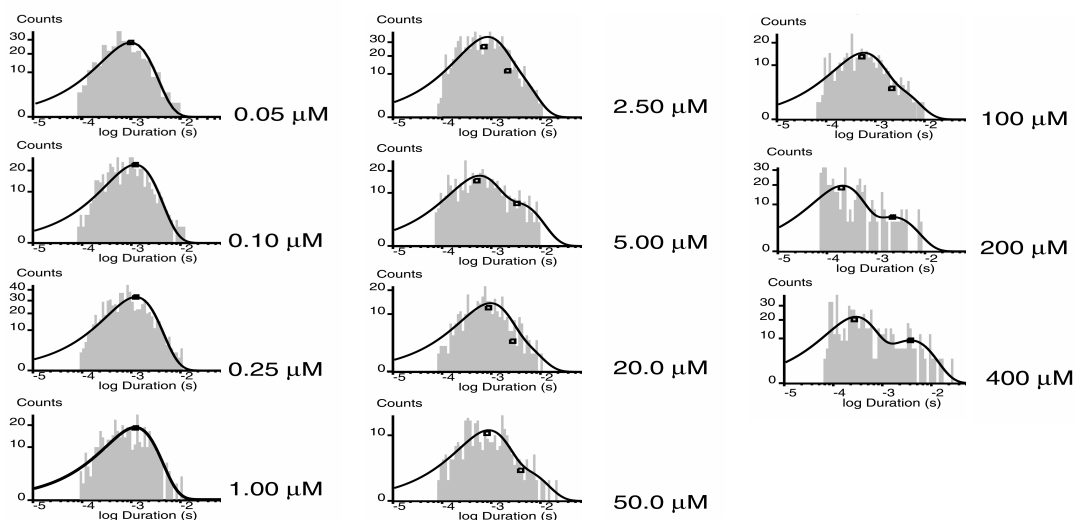


Figura 4.

Histogramas de los tiempos de estallido del AChR activados por LTG (μM).

Considerando que el tiempo de estallido del canal aumenta en función de la concentración de LTG aplicada en el *patch* y que el tiempo promedio de apertura del AChR activado por LTG disminuye en función de la concentración de LTG, cabría observar mayor número de aperturas por *burst* en función de la concentración de la LTG aplicada (Figura 5). Efectivamente, el número de eventos por estallido aumentó de $1,61 \pm 0,15$ a 0,05 μM LTG ($n=3$) a $6,43 \pm 1,44$ a 400 μM LTG ($n=3$).

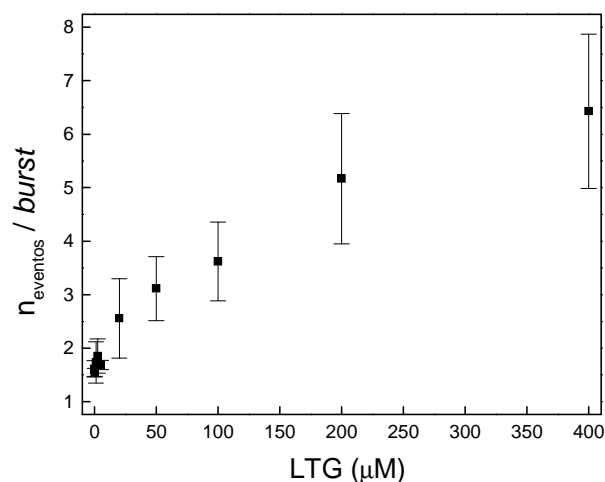


Figura 5.

Número promedio de aperturas del AChR dentro de un estallido graficado en función de la concentración de LTG (μM) aplicada.

1.2) Parámetros cinéticos del AChR activado por LTG

A continuación intentamos calcular las distintas constantes cinéticas del AChR activado por LTG. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el Capítulo 1 (LTG puede bloquear a los AChRs activados por $1 \mu\text{M}$ ACh a concentraciones superiores a $50 \mu\text{M}$) optamos por calcular las constantes cinéticas del AChR en un rango de concentraciones donde estuviésemos seguros que el único efecto posible de la LTG fuese la activación del receptor, es decir donde no se vieran efectos como la disminución de tiempo de estado abierto, etc.

Para evaluar la cinética de activación del AChR por LTG recurrimos al análisis de eventos sucesivos de estallidos obtenidos a concentraciones bajas ($0,05 - 1 \mu\text{M}$). A estas concentraciones la reapertura del canal es más lenta debido a bajas velocidades en los pasos de asociación (Esquema 1 en Capítulo 1). Los histogramas de tiempo de estallido del canal activados por LTG muestran un único componente que se corresponde con el tiempo de apertura del AChR. Por ello podemos concluir que a estas concentraciones de LTG

(0,05 - 1 μ M) los AChRs se abren mayoritariamente sólo una vez por episodio de activación (Figura 4).

Los histogramas de cierre (Figura 3) se ajustan correctamente con dos componentes, uno más largo, que corresponde a cierres entre episodios de activación de diferentes canales y que está relacionado con el número de canales en el *patch*, y otro más corto, que corresponde a transiciones entre los estados A_2R^* y A_2R . Los parámetros cinéticos medibles a estas concentraciones de LTG se relacionan con el Esquema 1, Capítulo 1 de la siguiente manera:

$$\tau_c \text{ (Tiempo medio del componente más breve de cierre)} = 1 / (\beta + k_{-2});$$

$$A\tau_c \text{ (área de } \tau_c) = \beta / (\beta + k_{-2});$$

$$\tau_{burst} \text{ (Tiempo de estallido)} = (1 + \beta / k_{-2}) (1 / \alpha).$$

De esta manera, se pueden determinar las constantes de apertura (β), la velocidad de cierre (α) y la velocidad de disociación (k_{-2}) de LTG al AChR (Tabla 2).

AChR	α (s^{-1})	β (s^{-1})	θ	k_{-2} (s^{-1})
ACh	1400 \pm 30	49000	35	57400 \pm 2300
LTG	1219 \pm 42	200 \pm 84	0,206	4025 \pm 1617

Tabla 2.

Parámetros cinéticos de los AChRs activados por LTG y ACh. Los datos para ACh fueron extraídos de Bouzat et al. (2000). Estos parámetros provienen de estudios de canal único del AChR muscular adulto expresado en células HEK-293. Los valores para LTG, en cambio, corresponden a cálculos efectuados en esta Tesis sobre los estudios electrofisiológicos realizados para el AChR muscular adulto expresado en células CHO-K1/A5.

El análisis realizado a partir de estas ecuaciones muestra que los AChRs activados por LTG presentan una velocidad de apertura de $200 \pm 84 s^{-1}$, una velocidad de cierre del canal de

$1219 \pm 42 \text{ s}^{-1}$, similar a la observada con el agonista natural ACh, una constante microscópica de disociación del ligando de $4025 \pm 1617 \text{ s}^{-1}$ -por el contrario muy inferior a la de la ACh- y una constante de gatillado del canal, θ de 0,206. Si comparamos este último valor con el descrito para ACh (Bouzat et al., 2000) podemos apreciar que la LTG exhibe una marcada disminución en el valor de θ en comparación a canales activados por ACh, sugiriendo una menor eficacia para activar los AChRs.

2) Corrientes macroscópicas del AChR

A continuación estudiamos si el AChR expresado en células CHO-K1/A5 es capaz de generar macrocorrientes cuando se lo expone a LTG.

A modo de control aplicamos un pulso de $50 \mu\text{M}$ ACh de 2 segundos de duración a distintos potenciales de membrana (-80 , -70 y -50 mV) sobre las células CHO-K1/A5. Como respuesta, obtuvimos macrocorrientes tales como las que se observa en la Figura 6a. Seguidamente, aplicamos sobre otra célula, de una cápsula diferente, un pulso de $100 \mu\text{M}$ LTG de 2 segundos de duración (Figura 6b). Procedimos de esta forma para evitar que quede ACh en el baño de la cápsula que pudiese generar dudas sobre el agonista responsable de la apertura de los AChRs. Como se muestra en la Figura 6b, la LTG activó a los AChRs y la respuesta fue dependiente del potencial de membrana aplicado.

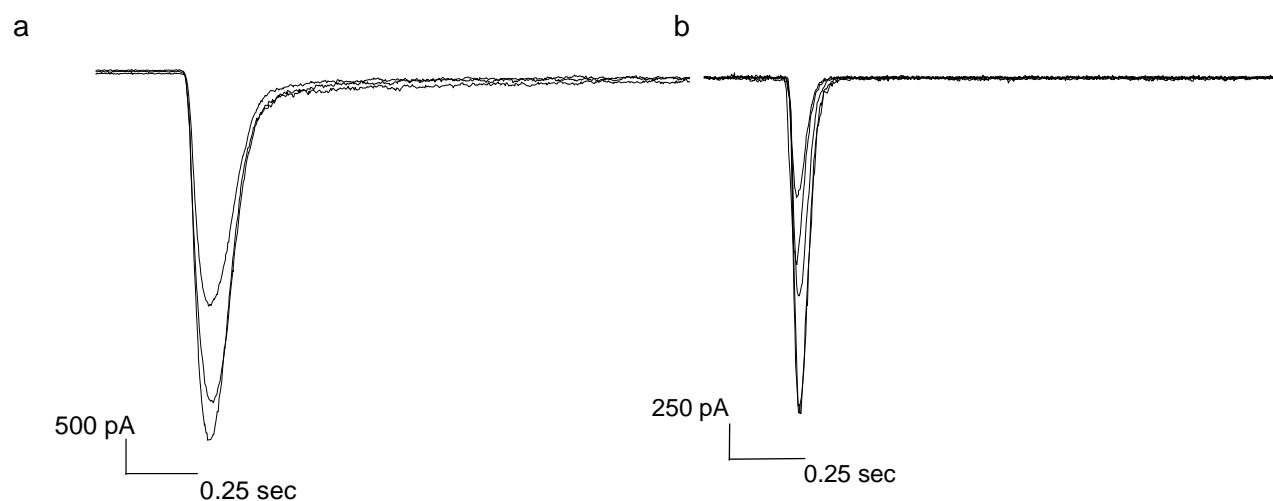


Figura 6.

La LTG activa corrientes macroscópicas en los AChRs expresados en células CHO-K1/A5. a) Corrientes macroscópicas en respuesta a la aplicación de pulsos de 2 segundos de 50 μM ACh a diferentes potenciales de membrana (-80, -70 y -50 mV), y b) pulsos de 2 segundos de LTG (100 μM) sobre los AChRs (-110, -90, -80, y -70 mV).

3) Efectos de la LTG sobre la unión de la α -BTX a células CHO-K1/A5 vivas.

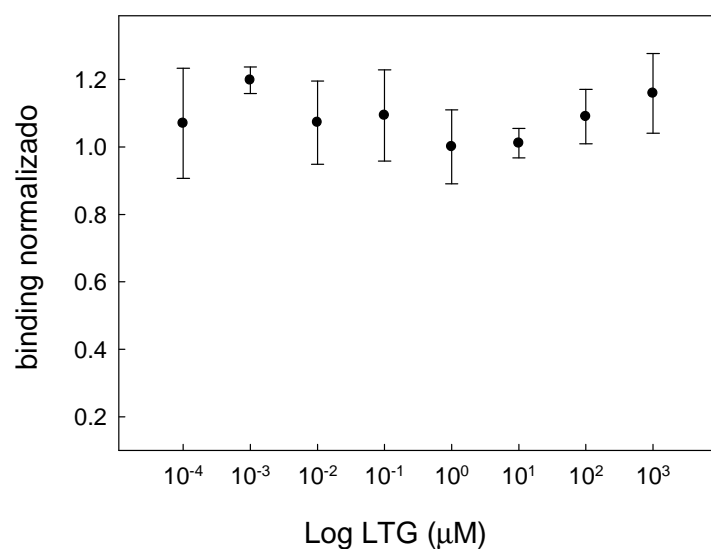
Con la finalidad de estudiar la capacidad de LTG de interactuar con el sitio de unión de ACh medimos el desplazamiento de la α -bungarotoxina (α -BTX^[125I]) del AChR.

Se realizaron dos series de experimentos. En primer lugar se midió la tasa inicial de ligazón de α -BTX^[125I] en células CHO-K1/A5 después de preincubar a las mismas durante 30 minutos con LTG (10^{-4} - 10^3 μM). Inesperadamente, en el rango de concentraciones estudiadas, la LTG no desplazó a la α -BTX^[125I] del sitio de unión del AChR (Figura 7a).

En segundo lugar, preincubamos las células CHO-K1/A5 con carbamoilcolina (Carb) o con el antagonista α -BTX (Figura 7b). Ambos compuestos inhibieron la unión de α -BTX^[125I] al AChR. Calculamos entonces el IC_{50} para la inhibición por Carb y por α -BTX en 35 μM y 36 nM, respectivamente (Figura 7b). Seguidamente, decidimos preincubar a las células CHO-K1/A5 con una concentración fija de LTG (100 μM) y concentraciones crecientes de Carb

(Figura 7b). Esto provocó que la curva de inhibición para Carb se desplace hacia la izquierda, es decir, la incubación conjunta con LTG causó una disminución en el valor de IC_{50} (~2.6 μ M) lo que indica que la LTG genera un aumento en la afinidad de Carb por el AChR.

a)



b)

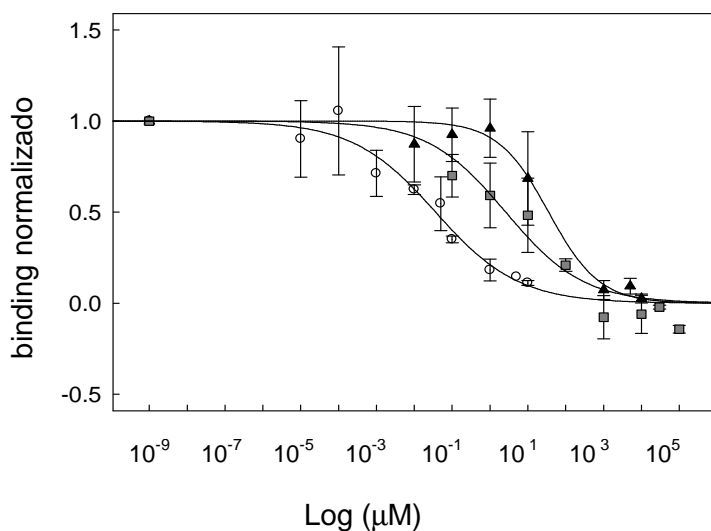


Figura 7.

a) La unión de α -BTX $^{[125]}$ al AChR expresado en células CHO-K1/A5 no se reduce por LTG. b) Reducción de la unión de α -BTX $^{[125]}$ al AChR por competencia con Carb (triángulos), α -BTX (círculos) y Carb más 100 μ M LTG (cuadrados).

4) LTG no inhibe la unión del antagonista α -BTX al AChR

Con el fin de confirmar la falta de inhibición de la unión de la α -BTX^[125I] al AChR por LTG, se marcaron células CHO-K1/A5 *in vivo* con α -BTX- Alexa Fluor⁴⁸⁸ (Figura 8).

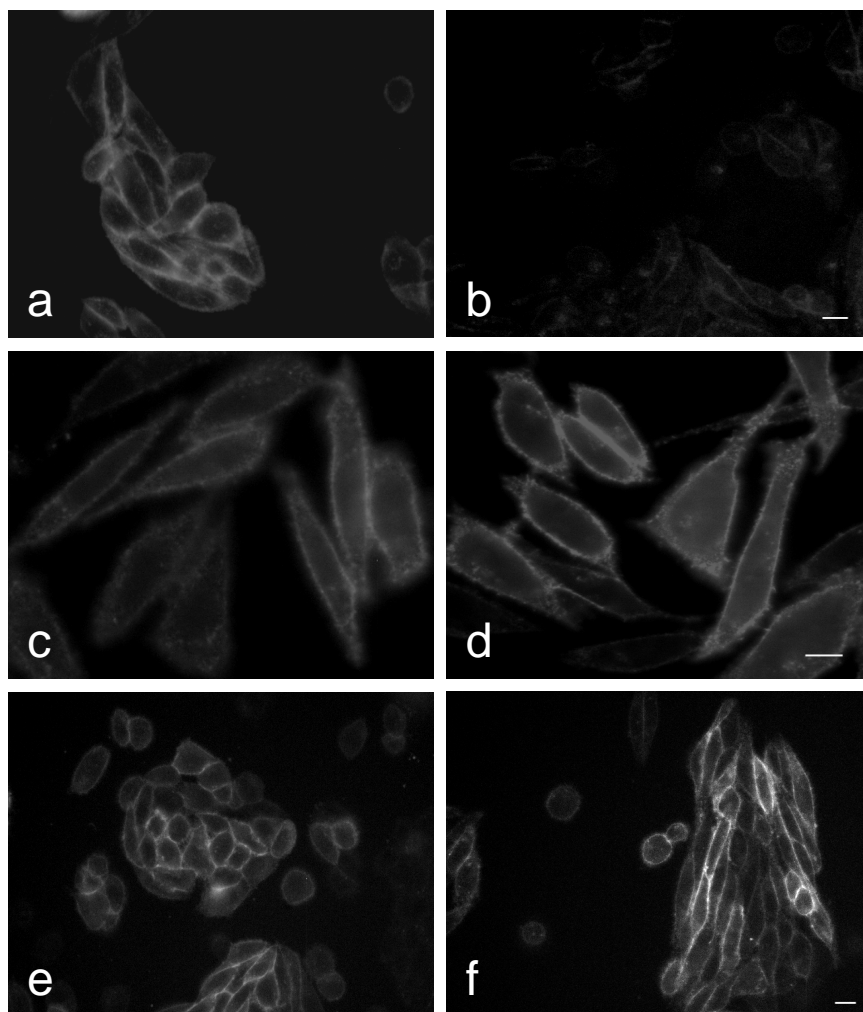


Figura 8.

Las células CHO-K1/A5 se trataron en medio libre de suero durante 2 hs en ausencia (a y c) o presencia de: 100 μ M Carb (b), 50 μ M LTG (d), o durante 24 hs en ausencia (e) o presencia (f) de 300 μ M LTG. Los AChRs de la superficie de las células CHO-K1/A5 se marcaron con la sonda fluorescente α -BTX -Alexa Fluor⁴⁸⁸. La barra indica 10 μ m.

A continuación se realizó la detección de la expresión en superficie del AChR. Se procedió de la siguiente manera: después de preincubar a las células CHO-K1/A5 durante 2 hs con 100 μM Carb, la fluorescencia de la superficie de las células se evaluó por estudios de microscopía de fluorescencia, comparándolas con células incubadas sin Carb (control). Como era de esperar, al competir el agonista Carb con la $\alpha\text{-BTX-Alexa Fluor}^{488}$ por el sitio de unión en el AChR, se observó una reducción considerable de la marcación del receptor en la membrana plasmática (Figuras 8a y b). Al realizar el mismo experimento -pero esta vez preincubando a las células durante 2 hs en presencia de 50 μM LTG (Figuras 8c y d)- la marcación en la superficie celular no se vio afectada con respecto al control. Procedimos entonces a aumentar el tiempo de incubación y la concentración de LTG para ver si bajo estas condiciones experimentales se podía observar alguna modificación en los niveles de marcación de la $\alpha\text{-BTX-Alexa Fluor}^{488}$. Para ello, preincubamos a las células CHO-K1/A5 durante 24 hs con 300 μM LTG (Figuras 8e y f). Aun bajo estas condiciones no se observaron diferencias con respecto a células incubadas en ausencia de LTG por el mismo período de tiempo.

Estos resultados confirman lo observado en los experimentos de ligazón con $\alpha\text{-BTX}^{[125\text{I}]}$, indicando que la LTG no desplaza al antagonista canónico competitivo $\alpha\text{-BTX}$ de su sitio de unión en el AChR.

5) Bloqueo del AChR por Lamotrigina.

Por más que la activación del AChR se produjo en todo el rango de concentraciones probadas de LTG (0,05-400 μM), a partir de 20 μM se observó una disminución significativa en el tiempo de estado abierto del canal (Figura 2 y Tabla 1). Esta disminución en la duración de τ_{open} se vio acompañada de un aumento del τ_{bursts} (Figura 4) y el surgimiento de un nuevo componente de aproximadamente unos 1,5 ms de duración en los histogramas de

tiempo de estados cerrados del canal (Figura 3). Todos estos datos sugerían que a concentraciones superiores de 20 μM de LTG la droga podría inhibir al AChR. A diferencia del Capítulo anterior, en el cual los canales eran activados por ACh y bloqueados por LTG, en esta sección estudiamos el bloqueo de los AChR activados por LTG.

5.1) Análisis de los parámetros cinéticos del AChR bloqueado por LTG

Los histogramas de cierre presentan dos componentes principales hasta concentraciones de LTG de 20 μM . A partir de 50 μM se comienza a ver un tercer componente de $\sim 1,50$ ms, al cual denominamos τ_{bloqueo} . Su duración permanece constante desde 50 a 400 μM , aunque no así su correspondiente área (amplitud cinética) en los histogramas, la cual aumentó en función de la concentración de la LTG. A las concentraciones más altas de LTG (200 y 400 μM) utilizadas en esta Tesis se puede apreciar la presencia de un cuarto componente, el cual, tal como explicáramos anteriormente, muy probablemente sea consecuencia de la desensibilización producida por estas altas concentraciones de la droga sobre el canal (Cachelin et al., 1989).

Dada la similitud de los efectos originados por LTG a estas concentraciones con los observados en el Capítulo anterior, cuando el AChR era activado por ACh y bloqueado por LTG, estudiamos si en este caso también se producía un bloqueo de tipo de canal abierto sobre el AChR activado por LTG, es decir, si la LTG estaba ejerciendo un efecto dual sobre el receptor: activador y bloqueador.

Si se aplica el modelo de bloqueo simple de canal abierto (ver Capítulo 1) a la acción ejercida por la LTG sobre el AChR (Figura 9) se pueden calcular la constante de bloqueo ($k_{+b}[\text{B}]$), la constante de desbloqueo (k_{-b}), la constante de cierre (α) y, a partir de $k_{+b}[\text{B}]$ y de k_{-b} , la constante aparente de disociación (K_d).

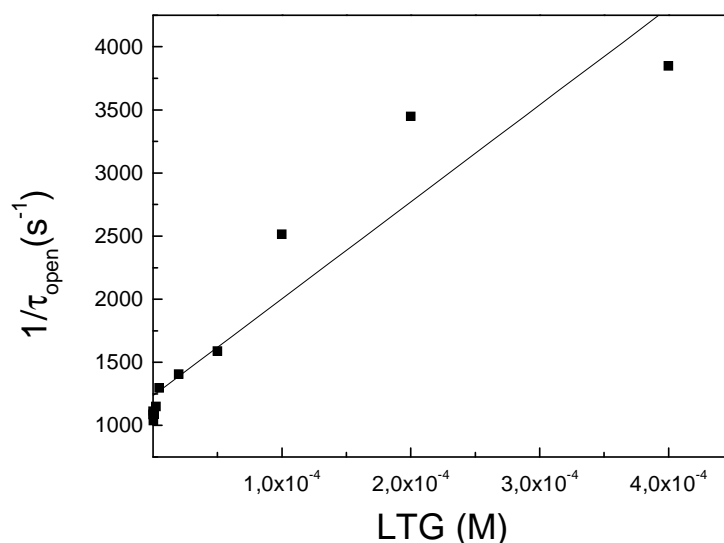
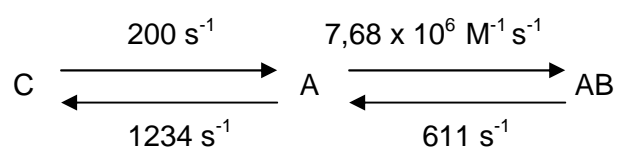


Figura 9.

Inversa del tiempo de apertura del AChR en función de la concentración de LTG (M) aplicada.

A partir de la pendiente de la curva se calculó $k_{+b}[B]$, arrojando un valor de $7,68 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que la constante de cierre del AChR se calculó de la intersección de la recta con el eje de la ordenada al origen en 1234 s^{-1} . También calculamos k_{-b} a partir de $1/\tau_{\text{bloqueo}}$ ($1/k_{-b}$) en 611 s^{-1} . Finalmente calculamos la constante aparente de disociación K_d , en $77,4 \mu\text{M}$. Cabe resaltar que el valor de α estimado por este método mostró coincidencia con el valor calculado a partir del tiempo de estallido (Tabla 2). De esta forma podemos completar las diferentes constantes en el Esquema 2 (Capítulo 1) de la siguiente manera:



Nota: el valor de β se obtuvo a partir de la Tabla 2.

Si se comparan estos valores con los obtenidos en el capítulo anterior (AChR activados por ACh en presencia de distintas concentraciones de LTG), no se observan diferencias significativas. Sin embargo, la importancia de estas observaciones adicionales radica en el

hecho que permiten disecar la doble acción de la LTG sobre el AChR, abriendo primero el canal que más tarde va a bloquear.

6) Efecto de la LTG sobre canales activados a altas concentraciones de ACh

A continuación intentamos distinguir entre las aperturas producidas por LTG de las efectuadas por ACh. Con este propósito, trabajamos a concentraciones de ACh que logran abrir a los AChR en los denominados “*clusters*” (Sakmann et al., 1980). Mediante la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* en la configuración célula adherida, se aplicó por la pipeta una concentración de 30 μM de ACh a las células CHO-K1/A5 (Figura 10a, fila superior). Al igual que las aperturas del AChR a bajas concentraciones de ACh (1 μM) el análisis del τ_{open} del AChR reflejó una duración media de este parámetro de ~ 1 ms (Figura 10b). Sin embargo, el análisis de los tiempos de estado cerrado (Figura 10b) presentaron tres componentes a altas concentraciones de ACh (30 μM) siendo el componente más breve ($0,60 \pm 0,11$ ms) el de mayor área ($0,91 \pm 0,08$). En lo que respecta a los tiempos de estallidos (*bursts*), se observaron dos componentes de igual contribución τ_{burst1} y τ_{burst2} , de $0,38 \pm 0,13$ ms y 63 ± 25 ms de duración, respectivamente (Figura 10b). El τ_{burst2} corresponde a las aperturas del AChR en *clusters* (Figura 10b).

Seguidamente, se co-aplicó a otro grupo de células, a través de una pipeta, 1 μM de LTG junto con 30 μM ACh y se analizaron los parámetros cinéticos, tomando como referencia los registros electrofisiológicos obtenidos en ausencia de LTG. Se eligió trabajar con 1 μM de LTG porque esta concentración no inhibe la actividad del AChR en presencia de ACh (Vallés et al., 2007) permitiendo de esta forma ver la interacción de ambos compuestos actuando como agonistas. Como era esperable, la duración del τ_{open} obtenido en estas condiciones fue igual al obtenido en ausencia de LTG (Figura 10a y 10b). Cuando se analizaron los tres componentes de estado cerrado del AChR, se evidenciaron diferencias en cuanto a la distribución de los mismos aunque no se observaron cambios en la duración de los τ_{cerrado} (Figura 10b).

Con respecto a los tiempos de estallido del canal, se destacó la presencia de un nuevo componente τ_{burst3} de $1,97 \pm 0,58$ ms de duración, el cual correspondería a las aperturas en estallido producidas por la LTG. Por otra parte, la duración de τ_{burst1} y τ_{burst2} no varió, aunque la contribución de τ_{burst1} aumentó considerablemente en detrimento de la de τ_{burst2} . Es interesante destacar que el histograma de τ_{bursts} obtenido mediante la co-aplicación de 30 μ M ACh y 1 μ M LTG, podría ser trazado como la suma de los histogramas obtenidos con cada una de estas drogas por separado (Figura 10c), con algunas diferencias en cuanto a la distribución de los componentes.

La interpretación más simple para describir este hecho es que en presencia de LTG, el equilibrio que permite que el canal se abra, cierre, re-abra y finalmente se desensibilice, se ve desplazado hacia el cierre del canal en lugar de hacia la reapertura del mismo, adquiriendo más importancia el componente más corto de τ_{burst} . Esto además sugiere que las acciones ejercidas por la ACh y la LTG sobre el AChR son independientes, dado que los componentes de τ_{burst} propios de la activación por cada agonista están presentes en condiciones de co-aplicación de los mismos.

Por último, incrementamos la concentración de la LTG usada en presencia de 30 μ M de ACh. Realizamos el mismo experimento pero esta vez aplicando 50 μ M de LTG en presencia de 30 μ M de ACh (Figuras 10a, 10b y 10c). Esto produjo una reducción del τ_{open} como consecuencia directa del bloqueo del canal. Se registró un nuevo componente de ~ 2 ms en el histograma de $\tau_{cerrado}$. Inferimos que este último corresponde al tiempo de bloqueo previamente observado en presencia de LTG (50 - 400 μ M). También se detectó un aumento importante en la contribución de τ_{burst3} al τ_{burst} total del AChR (Figuras 10b y 10c).

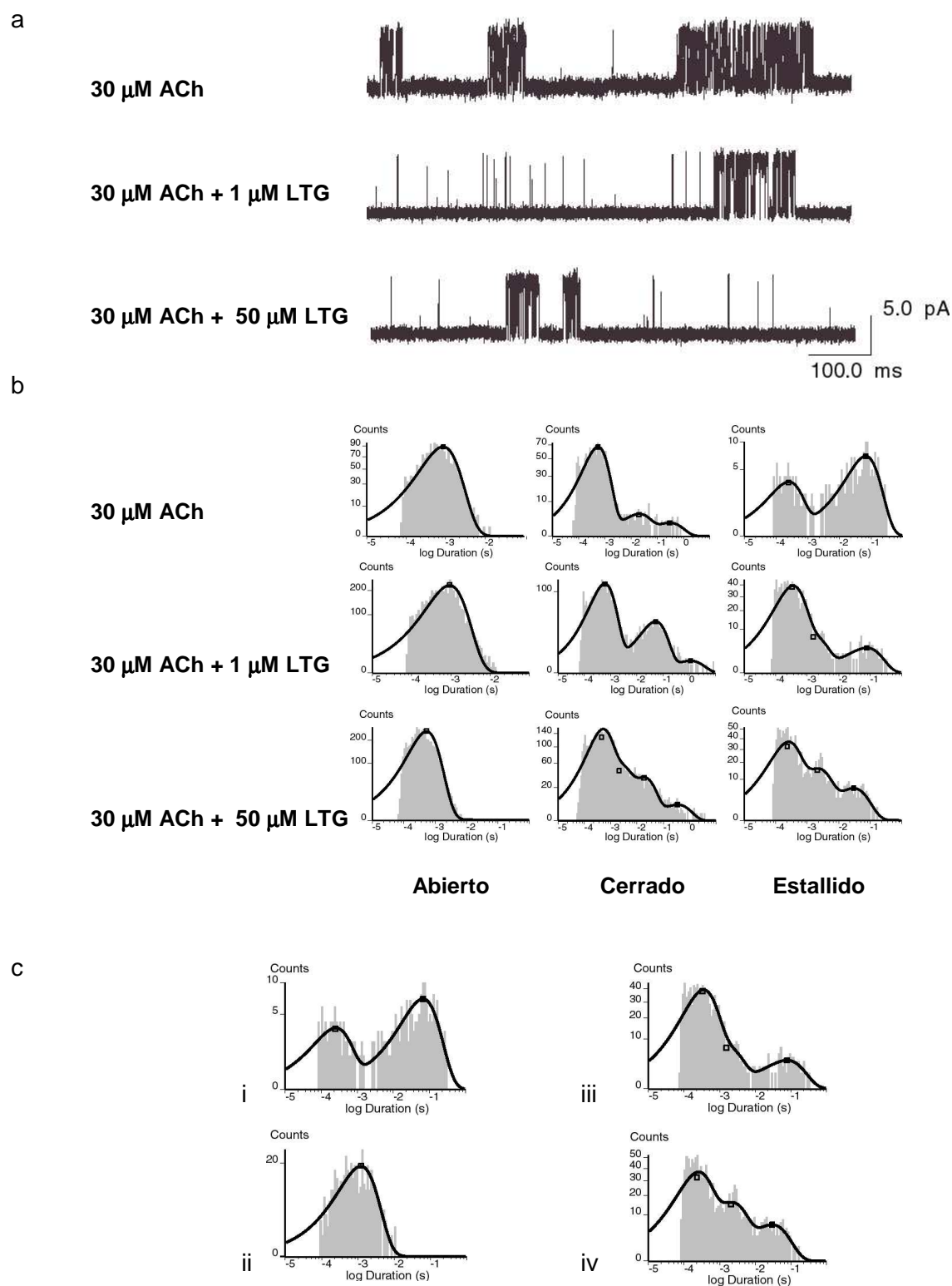


Figura 10.

La LTG modifica la cinética del AChR. Registros crudos obtenidos a partir de células CHO-K1/A5 en presencia de (a) 30 μM ACh (fila superior); 30 μM ACh + 1 μM LTG (fila media) y 30 μM ACh + 50 μM LTG (fila inferior). (b) Histogramas de tiempo de estado abierto (primera columna), cerrado (segunda

columna) y *estallidos* (tercera columna). (c) Comparación entre los histogramas de tiempos de *estallido* de (i) 30 μM ACh, (ii) 1 μM LTG, (iii) 30 μM ACh+1 μM LTG, y (iv) 30 μM ACh+50 μM LTG. Potencial de membrana: -80 mV. Filtro: 5 kHz.

Anexo 1**La LTG induce transiciones entre los estados de reposo y desensibilizados de los AChRs de *Torpedo***

Al haber observado que la LTG puede activar al AChR estudiamos si la LTG es capaz de producir los cambios conformacionales propios de un agonista del AChR. Con este fin, se hicieron una serie de experimentos de espectroscopía de fluorescencia en colaboración con la Dra. Silvia Antollini, quien pertenece a nuestro grupo de trabajo, utilizando una técnica que permite sensor los distintos estados conformacionales del AChR mediante el uso de una sonda fluorescente derivada de aminotriarilmetano, denominada Cristal Violeta (CrV) (Fernández Nievas et al., 2008).

Se realizaron experimentos con membranas ricas en AChR de *Torpedo californica* (en las cuales más del 50% de las proteínas presentes en las mismas corresponden al AChR) y la sonda Cristal violeta (CrV). Esta molécula fluorescente se comporta como un bloqueador de canal del AChR y posee alta afinidad por el estado desensibilizado del receptor (Lurtz et al., 1999), hecho que se manifiesta por la disminución de un orden de magnitud de la constante de disociación (K_D) del CrV entre el estado de reposo (R) y el estado desensibilizado (D) del AChR. A modo de control, las membranas ricas en AChR se titularon con concentraciones crecientes de CrV en presencia de 1 mM Carb (estado D), y en ausencia de agonista (estado R). A continuación, se calcularon las K_D s aparentes para ambos estados (Figura 11a) obteniéndose un valor de $43,8 \pm 10$ nM y de $326,4 \pm 31$ nM respectivamente, confirmando la marcada preferencia del CrV por el estado desensibilizado del AChR.

Con la finalidad de estudiar si la LTG actúa efectivamente como un agonista del AChR, se realizaron estudios semejantes a los controles, pero esta vez agregando concentraciones crecientes de LTG (0–500 μ M) en lugar de Carb. En estas condiciones, se observó que la K_D del CrV disminuyó de manera dependiente de la concentración de LTG con respecto al

valor del control (estado de R) (Figura 11b). Además, la saturación del efecto se alcanzó a concentraciones bajas de LTG (5 μM). Seguidamente y con la intención de ver si la LTG y la Carb producían efectos aditivos, se preincubaron las membranas ricas en AChR con Carb 1 mM con adición posterior de concentraciones crecientes de LTG (2,5–500 μM) y se calcularon las K_D de CrV correspondientes. A todas las concentraciones de LTG agregadas, las K_D fueron similares a las obtenidas con membranas tratadas sólo con 1mM de Carb o con LTG (a concentraciones iguales o mayores a 5 μM). Esta serie de experimentos apoya la idea que LTG a bajas concentraciones se comporta como un agonista del AChR, al inducir una transición desde el estado R al D en el AChR, de manera similar a Carb. Un hecho adicional que sostiene la idea que LTG se comporta como un agonista del AChR, es que una vez que esta transición ocurre (por activación previa con Carb), la adición sucesiva de LTG no causa ningún cambio adicional, lo que indicaría que ambas moléculas desencadenan los mismos cambios conformacionales.

A continuación se efectuaron estudios similares a los descritos en el párrafo anterior pero esta vez bloqueando completamente el sitio del agonista Carb con α -BTX. En estas condiciones no se modificó la K_D aparente del CrV para el estado R en presencia de α -BTX (Figura 11b, inserto). Tampoco se observaron modificaciones en la K_D del CrV cuando las membranas se expusieron a Carb luego de la incubación con α -BTX, lo que indica que los sitios del agonista fueron bloqueados completamente (Figura 11b, inserto). Sin embargo, cuando se agregó LTG después de la preincubación con α -BTX, la K_D del CrV disminuyó de un modo similar al observado en presencia de LTG sola. Esto indica que la LTG puede activar al AChR aun cuando los sitios del agonista se encuentran bloqueados por el antagonista competitivo α -BTX (Figura 11a y b), lo que sugiere que la LTG activaría al AChR por localización en un sitio distinto al del agonista natural.

Para diseccionar el comportamiento dual de la LTG (agonista vs antagonista no competitivo, bloqueador de canal abierto) se compararon los resultados obtenidos utilizando altas concentraciones de LTG con los obtenidos con un reconocido bloqueador de canal abierto

del AChR, el anestésico local QX-314 (Neher y Steinbach, 1978), tanto en presencia como en ausencia de α -BTX o de Carb (Figura 11c). La K_D del CrV obtenida en membranas ricas en AChR tratadas solamente con QX-314, o después de incubación con α -BTX o con Carb, fue similar a la del estado de R, indicando que el bloqueador de canal abierto no cambia la conformación del AChR. Así, las diferencias entre los estados conformacionales del AChR en presencia de 500 μ M LTG o de QX-314 confirman que la LTG tiene un efecto dual sobre el AChR: a altas concentraciones, la LTG no sólo actúa como un bloqueador de canal abierto sino que también activa y desensibiliza al AChR.

En base a los resultados anteriores indicando que la LTG se localizaría en sitios distintos a los de Carb, se comparó su efecto sobre la K_D del CrV con los efectos ejercidos por galantamina y fisostigmina, dos ligandos potenciadores alostéricos (APL) del AChR (Figura 11d). Se comprobó que ni la galantamina ni la fisostigmina indujeron cambios en la K_D del CrV con respecto al valor del control para el estado de R. Además, cuando estos dos APL fueron agregados luego de la incubación de las membranas con α -BTX o Carb, la K_D de CrV tampoco cambió con respecto a los controles, sugiriendo que la LTG modula al AChR por un mecanismo diferente al utilizado por los APL.

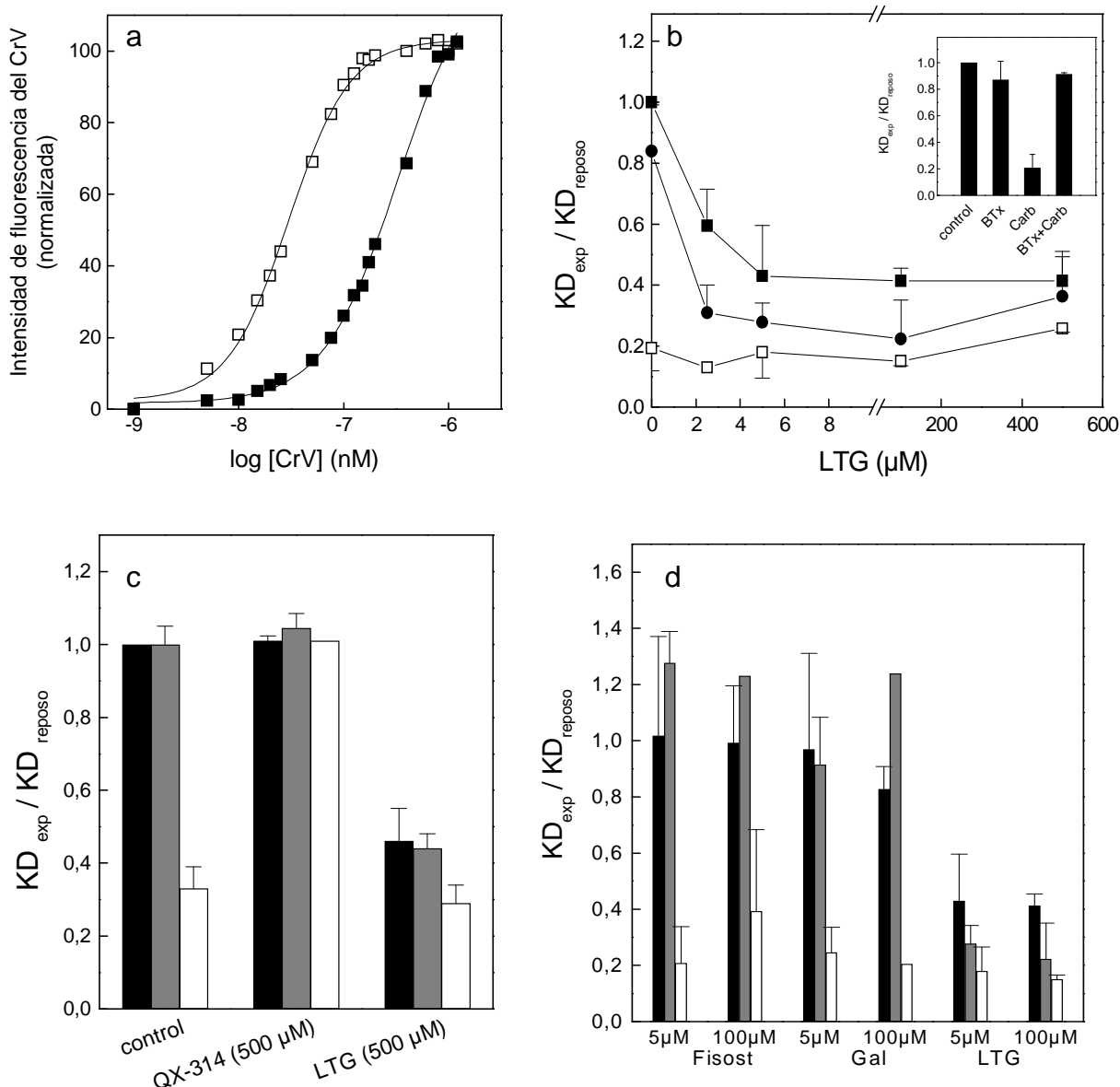


Figura 11.

a) Intensidad de fluorescencia del CrV en ausencia (■) o presencia (□) de 1 mM Carb. La sonda CrV fue directamente agregada a una suspensión de membranas ricas en AChR de *Torpedo*. b) Relación entre los K_D s obtenidos en presencia de concentraciones crecientes de LTG con respecto al K_D control del AChR en el estado de reposo (■, suspensión de membranas ricas en AChR solamente; □, membranas en presencia de 1 mM Carb; ●, membranas en presencia de 1,5 μ M α -BTX). Las K_D s aparentes fueron calculadas mediante el ajuste de los datos (intensidad de fluorescencia en función de la concentración de CrV agregada) a una curva sigmoidea. *Inserto*: relación entre las K_D calculados en presencia de 1 mM Carb, 1,5 μ M α -BTX o 1 mM Carb más 1,5 μ M α -BTX y la K_D control del estado R. c) Comparación entre LTG y el bloqueador de canal abierto QX-314. Los

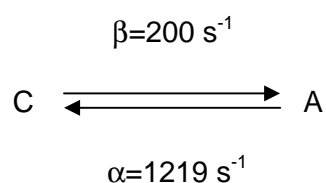
valores se obtuvieron a partir de la suspensión de membranas ricas en AChR solamente (columnas negras), o en la presencia de 1 mM Carb (columnas blancas), o en presencia de 1,5 μ M α -BTX (columnas grises). d) Comparación entre LTG (5 y 100 μ M) y fisostigmina (5 y 100 μ M) o galantamina (5 y 100 μ M), en ausencia (columnas negras), o en presencia de 1 mM Carb (columnas blancas), o en presencia de 1,5 μ M α -BTX (columnas grises). Cada columna/símbolo corresponde al promedio \pm D.E. de al menos cuatro experimentos independientes.

Discusión

En el Capítulo 1 describimos la acción de la droga anticonvulsivante LTG sobre el AChR muscular como una modulación de tipo inhibitoria no competitivo. La LTG se comporta en este contexto como un bloqueador de canal abierto del AChR. Sin embargo, este mecanismo no permite explicar el efecto observado sobre la viabilidad celular ejercida por la LTG sobre las células CHO-K1/A5 que expresan de forma estable al AChR.

En este Capítulo se estudió qué otro tipo de interacción ejerce la LTG sobre el AChR muscular. El hallazgo más notable es que la LTG activa por sí misma al AChR muscular en todas las concentraciones probadas (Figura 1). Es más, la activación del AChR por LTG mostró varias semejanzas con la acción ejercida por el agonista natural, ACh. Esta interacción fue demostrada por una combinación de técnicas y procedimientos experimentales que comprendieron estudios electrofisiológicos, de microscopía, de radioligandos y de fluorescencia en cubeta.

De acuerdo con los datos electrofisiológicos la LTG abre al canal durante ~ 1 ms con una velocidad de apertura de 200 s^{-1} y una velocidad de cierre de 1219 s^{-1} .



El valor de β para LTG es 250 veces inferior a la velocidad de apertura del AChR por el agonista natural, la ACh, mientras que la velocidad de cierre es similar para los dos agonistas. A partir de estos valores calculamos la constante de gatillado del canal en el equilibrio θ (β/α), que arrojó un valor de 0,206. Este valor es mucho menor (170 veces) al calculado para el agonista natural ACh ($\theta=35$). Esto refleja que la LTG es mucho menos eficiente que la ACh en inducir la apertura del AChR. Una manifestación de este bajo valor de θ podría ser la ausencia de activación en *clusters* del AChR por la LTG (Figura 1). Si este fuese el caso entonces ningún agonista con valores de θ similares al obtenido sería

capaz de producir activación en *clusters*. Sin embargo, la colina, un agonista parcial, es capaz de producir este tipo de activación a concentraciones saturantes (20 mM) y posee un valor de $\theta = 0,034$, menor aún que el obtenido para la LTG (Grosman y Auerbach, 2000).

La ausencia de *clusters* también puede resultar de una disminuida afinidad de la LTG en comparación con la ACh. En el desarrollo de esta Tesis no pudo calcularse la constante de afinidad de la LTG por el AChR ya que el anticonvulsivo no produjo desplazamiento del antagonista competitivo α -BTX[125 I] (Figura 7a). Por lo tanto, queda la posibilidad que la LTG interactúe con el AChR con menor afinidad que la ACh. Otra alternativa radica en el hecho que para que se evidencien *clusters* de activación el receptor debe estar expuesto a altas concentraciones de agonista (Sakmann et al., 1980). Dado que a concentraciones altas la droga comienza a ejercer un efecto dual sobre el AChR (Figura 1), la activación en *clusters* podría no evidenciarse debido al bloqueo del canal. Debemos recalcar que la duración de la activación del AChR en estallidos aumenta en función de la concentración de LTG (0,05-5 μ M) y en este rango de concentraciones no hay datos que sugieran que ya exista bloqueo (Figura 4). Consecuentemente, creemos que esta última alternativa sería la responsable de la ausencia de *clusters* de activación.

La activación de los AChRs expresados en las células CHO-K1/A5 también se hizo evidente al observar la generación de macrocorrientes tras la exposición a 100 μ M LTG (Figura 6). Sin embargo, como se mencionó en el párrafo anterior, la LTG fue incapaz de reducir la tasa inicial de ligazón de α -BTX[125 I] sobre el AChR (Figura 7a). Asimismo, estudios de microscopía de fluorescencia mostraron que la marcación en superficie de estas células con α -BTX-Alexa Fluor⁴⁸⁸ no es afectada por la LTG (Figura 8).

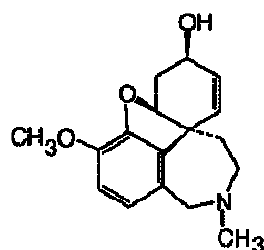
En conjunto, estos resultados nos condujeron a hipotetizar que la LTG podría actuar a través de un sitio diferente al usado por los agonistas canónicos y por el antagonista competitivo α -BTX.

Los experimentos de fluorescencia en cubeta realizados por la Dra. Antollini nos permitieron verificar nuestra hipótesis (Figura 11). A todas las concentraciones estudiadas (2,5-500 μ M)

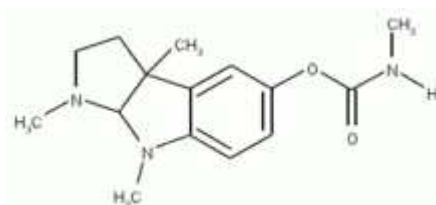
la LTG imitó la respuesta observada con el agonista típico Carb, aun en condiciones de obstrucción de los sitios de unión de agonistas nicotínicos por α -BTX.

En los últimos años, una serie de compuestos ha cobrado relevancia por su capacidad de activar a los receptores nicotínicos sin interactuar con el sitio de unión usado por el agonista natural, ACh. Estas moléculas se denominan APL (“*allosterical potentiating ligands*”), siendo la galantamina, la fisostigmina y la codeína los APL más reconocidos (Storch et al., 1995; Pereira et al., 1993). Los dos primeros son asimismo inhibidores de la acetilcolinesterasa.

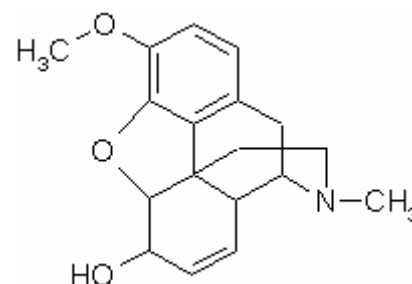
Galantamina



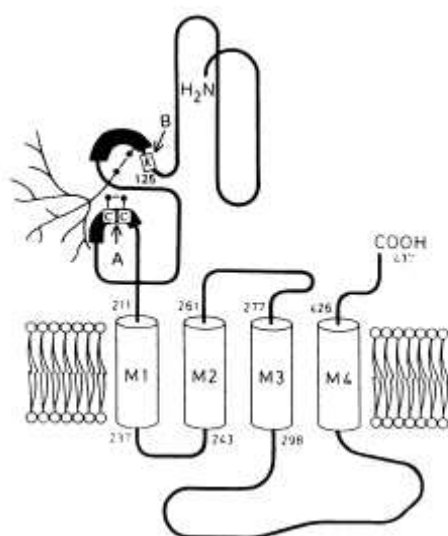
Fisostigmina



Codeína



Estos compuestos sólo son desplazados de su sitio de unión al AChR por el anticuerpo FK1 que se une específicamente a la Lys-125 de la subunidad α del AChR (Pereira et al., 1995).



Representación esquemática del sitio tentativo de unión de los APL en la Lys-125 de la subunidad α del AChR, según Pereira et al. (1993).

Decidimos comparar entonces los efectos de la LTG con el de dos de las moléculas de tipo APL más comunes, galantamina y fisostigmina (Figura 11d). Ambas drogas activan el AChR muscular a nivel de canal único (Akk et al., 2005; Shaw et al., 1985). Sin embargo, una diferencia importante entre la LTG, la galantamina y la fisostigmina radica en el hecho que la LTG puede generar corrientes macroscópicas (Figura 6) al aplicarla sobre los AChRs, mientras que ni la galantamina ni la fisostigmina lo pueden hacer (Samochocki et al., 2003; van der Beukel et al., 1998). Tampoco se observaron semejanzas entre las características de la desensibilización del AChR inducida por la LTG y aquella generada por la galantamina o la fisostigmina, ya que cuando se estudiaron los cambios conformacionales del AChR sólo la LTG pudo disminuir la K_D del CrV tanto en ausencia como en presencia de α -BTX (Figura 11d). A partir de estos resultados podemos inferir que si bien la LTG es menos eficiente que el agonista ACh, es más potente que los APL galantamina y fisostigmina. Finalmente, existen además diferencias marcadas entre las propiedades de solubilidad de los dos APL por un lado (solubles en agua) y la LTG (soluble en solventes orgánicos) por otro, lo que refuerza la idea que la LTG probablemente actúa a través de un sitio diferente del empleado por los APL. Adicionalmente, la LTG posee dos grupos ionizables, y la formación de pares iónicos entre el AChR y la LTG podría ser responsable del efecto agonista. Sin embargo, esta posibilidad puede descartarse dado que la LTG a pH 7,4 se encuentra en su forma no ionizada (Mashru et al., 2005).

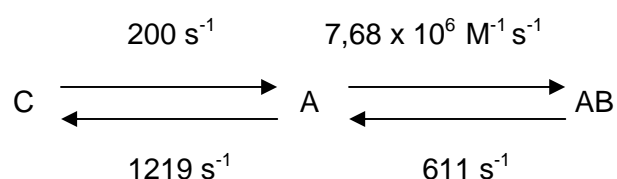
La LTG también demostró ser un regulador alostérico positivo del AChR (Figura 7b) ya que en los estudios de desplazamiento de la α -BTX[125], cuando la LTG se aplicó junto con concentraciones crecientes de Carb, se produjo una reducción en el IC_{50} para la inhibición α -BTX[125] por Carb (de $\sim 35 \mu\text{M}$ a $\sim 2,6 \mu\text{M}$), indicando que en presencia de LTG, Carb evidencia mayor afinidad por el AChR (Sine et al., 1979; Katz et al., 1957).

En conclusión, los datos que surgen de esta Tesis indican que la LTG activa al AChR muscular de modo diferente a los descriptos hasta el día de hoy para agonistas clásicos y APL.

No obstante, a altas concentraciones de LTG (50 – 400 μM) se observó también un efecto inhibitorio sobre el AChR, en coincidencia con lo observado en el capítulo anterior (Vallés et al., 2007). Al exponer el receptor solamente a LTG (50 – 400 μM) se observó:

- (a) una disminución del tiempo durante el cual el canal permanece abierto (Figura 2 y Tabla 1),
- (b) un aumento de la duración del tiempo de estallido del canal (Figura 4),
- (c) un aumento del número de aperturas por estallido del canal (Figura 5),
- (d) cambios en la distribución de los componentes de tiempo de estado cerrado del canal (Figura 3),
- (e) la aparición de un tercer componente de estado cerrado del canal (τ_{bloqueo}) cuya duración permaneció constante mientras que su peso relativo en los histogramas aumentó en función de la concentración de LTG aplicada (Figura 3),
- (f) la aparición de un cuarto componente de estado cerrado del canal (200 y 400 μM) del orden de segundos que como se mencionó anteriormente probablemente represente la desensibilización que sufre el canal a tan altas concentraciones de LTG (Figura 3).

Nuevamente aplicamos el modelo simple de bloqueo del canal para describir la obstrucción del AChR por LTG de canales activados por este mismo compuesto.



Cuando la LTG supera concentraciones entre 20 y 50 μM deja de comportarse únicamente como agonista del AChR para tener un efecto dual sobre el receptor nicotínico (activador/bloqueador). Según este modelo, la acción bloqueadora de la LTG se puede deducir del análisis de los registros electrofisiológicos obtenidos en presencia de LTG

(Figura 1) ya que la constante de desbloqueo del AChR tiene una velocidad adecuada para permitir observar el fenómeno de “*flickering*” de los canales (50-400 μM). La transición al estado AB disminuye el tiempo durante el cual el canal se encuentra en el estado abierto y retrasa el cierre del AChR (Figura 2). Consecuentemente, se produce una mayor duración de los estallidos y del número de eventos por estallido (Figuras 4 y 5).

No se encontraron diferencias entre el presente análisis y el que describimos en el Capítulo anterior con la acción combinada de ACh y LTG (Vallés et al., 2007). Estos resultados sugieren que la potencia de la LTG como agente bloqueador del AChR no se ve influenciada por la presencia de otros agonistas como por ejemplo la ACh, y que la activación y el bloqueo por LTG son procesos independientes.

Esto también se demostró cuando se co-aplicó LTG (1 μM) y ACh (30 μM), ya que bajo estas condiciones se produjo un aumento en el peso relativo del componente de tiempo de estado cerrado, que refleja la duración del canal cerrado entre aperturas de eventos aislados, τ_{cerrado2} (Figura 10). Interpretamos que este comportamiento es el resultado del aumento del número de aperturas individuales generadas por la LTG sobre el AChR. A concentraciones de LTG que causan el bloqueo del canal (50 μM) también se observó el componente correspondiente al estado bloqueado, τ_{bloqueo} , en los histogramas de tiempo de estado cerrado.

Por último, se comparó si la capacidad de producir la desensibilización del AChR estaba relacionada con el efecto bloqueador de la LTG (Figura 11c). Para ello se realizaron estudios de fluorescencia en cubeta con membranas ricas en AChR en presencia de QX-314, que es un conocido bloqueador de canal abierto del AChR (Neher y Steinbach, 1978). Como era esperable, este compuesto no modificó la K_D del CrV, ya sea en presencia o en ausencia de α -BTX o Carb, lo cual sugiere que las transiciones de estado del AChR, evidenciables como cambios de fluorescencia del CrV, son el resultado de la acción de la LTG sobre los AChRs. De todo esto concluimos que el comportamiento de la LTG sobre el

canal se asemeja más al de un activador que al de un bloqueador del mismo (Vallés et al., 2008).

Queda entonces por resolver si el efecto agonista de la LTG sobre el AChR es el responsable de preservar la viabilidad en células CHO-K1/A5 deprivadas de suero observado en el Capítulo 1. Esta hipótesis estaría de acuerdo con los estudios realizados sobre el receptor $\alpha 7$ expresado en células SHSY-5Y, en las cuales la nicotina, actuando como agonista de los AChRs, ejerce asimismo efectos antiapoptóticos (Copeland et al., 2007).

Capítulo 3

**“Expresión del receptor nicotínico neuronal $\alpha 7$
en la superficie celular de células $\alpha 7$ -AChR-
Ric-3”**

Expresión del receptor nicotínico neuronal $\alpha 7$ en la superficie celular de células $\alpha 7$ -AChR-Ric-3

Antecedentes y objetivos

Los AChRs neurales participan activamente en un sinnúmero de procesos celulares y fisiológicos. Se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC y en el SNP. Los receptores neurales pueden ensamblarse como homopentámeros, como el caso de los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 8$ (Couturier et al., 1990) o como heteropentámeros, como el caso de los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$ (ver revisión en Lindstrom, 2003).

Uno de los subtipos más abundantes de AChRs en el SNC de mamíferos es el receptor homomérico $\alpha 7$ (Role y Berg, 1996). En particular, el hipocampo, el área del cerebro asociada preponderantemente con procesos del aprendizaje y la memoria, presenta el mayor nivel de expresión de este subtipo de receptor de todo el SNC. Los $\alpha 7$ AChR pueden actuar presinápticamente, postsinápticamente o perisinápticamente, facilitando la liberación de neurotransmisores, mediando la transmisión sináptica rápida (Jones et al., 1999) o modulando otras conexiones con diferentes neuronas a través de diversas vías de señalización. Se cree que estas funciones son llevadas a cabo merced a su alta permeabilidad al calcio (Séguéla et al., 1993) ya que la entrada de Ca^{2+} facilita la liberación de neurotransmisores y la transducción de señales. También se los relaciona con numerosas enfermedades como el mal de Alzheimer, la esquizofrenia, ciertos tipos de epilepsia y el mal de Parkinson (revisiones en Barrantes, 1998; Gotti y Clementi, 2004).

Comprender el mecanismo de acción de estas enfermedades es la base fundamental para el diseño y desarrollo de fármacos contra las mismas, requiriéndose para tal fin una caracterización lo más exhaustiva posible de la cinética de activación del canal, así como de

los mecanismos de acción farmacológica interviniente en la modulación de la actividad de los receptores.

La expresión heteróloga funcional del $\alpha 7$ AChR en células de mamífero ha sido prácticamente imposible de llevar a cabo hasta la fecha. La existencia de datos en la literatura sobre la expresión heteróloga del $\alpha 7$ AChR en varios tipos de células es exigua (Puchacz et al., 1994; Zhao et al., 2003), siendo la detección de receptores funcionales aun más difícil de obtener (Cooper y Millar, 1997). Recientemente se ha descrito que la proteína Ric-3 aumenta la expresión heteróloga del $\alpha 7$ AChR tanto en ovocitos como en líneas celulares de mamífero como la línea humana HEK-293 (Williams et al., 2005). La proteína Ric-3 sería necesaria para lograr el correcto plegado y/o ensamblado del $\alpha 7$ AChR, y de esta manera lograr la expresión de receptores funcionales en la superficie celular (Williams et al., 2005). Ric-3 no aumentaría el transporte de $\alpha 7$ desde el retículo endoplasmático hacia la membrana, sino que facilitaría el correcto ensamblaje del receptor y de esta manera aumentaría el número de receptores funcionales en la membrana plasmática. Se cree que en ausencia de esta proteína no se produciría la palmitoilación en los $\alpha 7$ AChR, impidiendo su expresión funcional cuando estos se expresan heterológamente en células HEK-293 (Drisdell et al., 2004). En el trabajo de Drisdell y colaboradores (2004), los autores plantean que en células que expresan endógenamente a los $\alpha 7$ AChR, como las PC12, la palmitoilación se produce en el retículo endoplasmático, en el cual el palmitato se une covalentemente a residuos cisteínas (Figura 1).

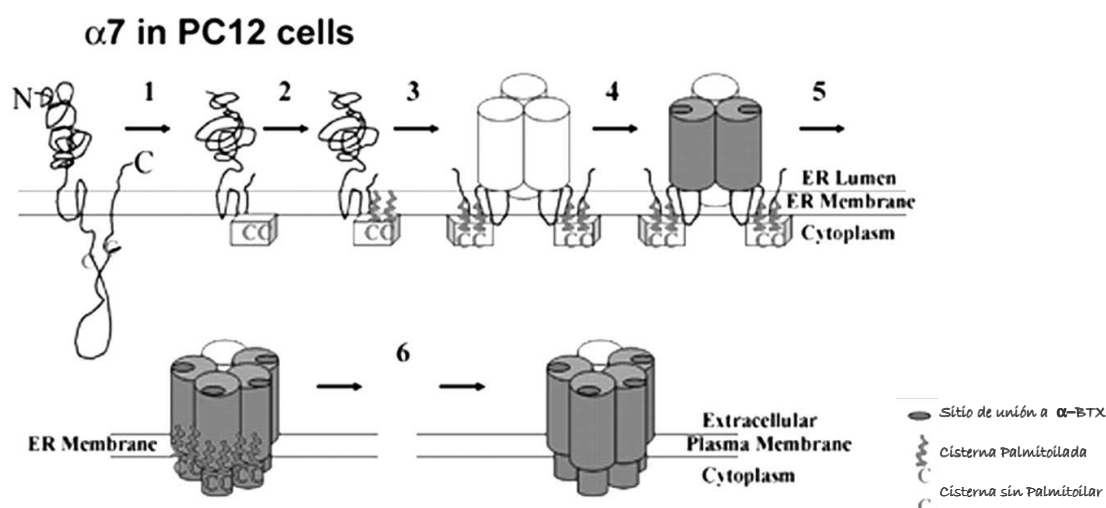


Figura 1.

Proceso de palmitoilación en células que expresan endógenamente al $\alpha 7$ AChR. Extraído y modificado de Drisdell et al. (2004).

En las células que expresan endógenamente al $\alpha 7$ AChR, los residuos cisteínas de las subunidades $\alpha 7$, sitios potenciales para sufrir palmitoilación, son originalmente inaccesibles a este proceso. En el primer paso del modelo que plantean Drisdell et al., las subunidades $\alpha 7$ comienzan a plegarse y a sufrir una serie de cambios conformacionales que resultan en la accesibilidad de las cisteínas para ser palmitoiladas (Figura 1). En el segundo paso, las cisteínas son palmitoiladas, proceso que permite un correcto ensamblado de los $\alpha 7$ AChRs y la adquisición de su capacidad funcional (Figura 1, pasos 3-5). Posteriormente, los $\alpha 7$ AChRs son liberados del retículo endoplasmático y transportados a la membrana plasmática (paso 6). Allí los $\alpha 7$ AChR son depalmitoilados, proceso que parece no afectar su función (Figura 1).

En líneas celulares que no expresan al $\alpha 7$ AChR en forma endógena, como las HEK-293, el paso 1 no ocurriría dada la ausencia de una proteína que medie este paso tan necesario para el correcto plegado y procesamiento del $\alpha 7$ AChR (Figura 2).

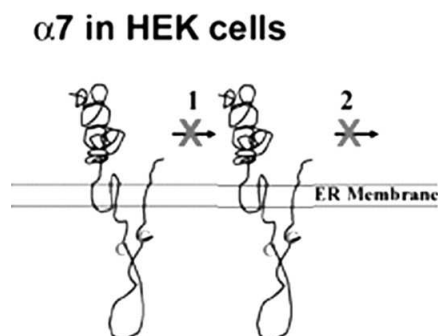


Figura 2.

El proceso de palmitoilación de la subunidad $\alpha 7$ del AChR no ocurre en células que no expresan endógenamente al $\alpha 7$ AChR. Extraído y modificado de Drisdell et al. (2004).

Debemos resaltar que otras proteínas sí son palmitoiladas en este tipo de células. Posiblemente el papel de Ric-3 sería el de actuar como proteína chaperona específica, la cual haría accesible los residuos cisteínas de $\alpha 7$ para la palmitoilación en el retículo endoplasmático, ya que tanto en células PC12 como en ovocitos la proteína Ric-3 se expresa endógenamente (Williams et al., 2005). Esta proteína fue inicialmente descubierta en el nematodo *C.elegans*, y posiblemente sea la chaperona faltante tanto en células HEK-293 como en otras líneas celulares en las cuales no se ha logrado aun la expresión de $\alpha 7$ AChR funcionales.

Es importante destacar que hasta la fecha sólo se han descrito registros de corrientes a nivel de canal único del $\alpha 7$ AChR salvaje en ovocitos (Fucile et al., 2002).

En este capítulo de la Tesis se describirán los pasos llevados a cabo para lograr la expresión en membrana plasmática del $\alpha 7$ AChR humano en la línea celular SHE-P1-h $\alpha 7$ y su caracterización a nivel de canal único de la cinética del $\alpha 7$ AChR activado por ACh.

Resultados

1) Detección del $\alpha 7$ AChR en células SHE-P1- $h\alpha 7$

Mediante la técnica de RT-PCR se analizaron los ARN mensajeros productos de la extracción del ácido ribonucleico de las siguientes líneas celulares de mamífero: SHE-P1 null o salvaje, las SHE-P1- $h\alpha 7$, que corresponden a las células SHE-P1 tranfectadas con el ADNc que codifica para el $\alpha 7$ AChR (Zhao et al., 2003), la línea CHO-K1- $\alpha 7$ -GFP (células CHO-K1 que fueron tranfectadas en forma estable con $\alpha 7$ -GFP) y por último de la línea CHO-K1/SPH⁻, fibroblastos que expresan al AChR muscular adulto y que poseen una deficiencia metabólica en la producción de esfingomielina (Roccamo et al., 1999).

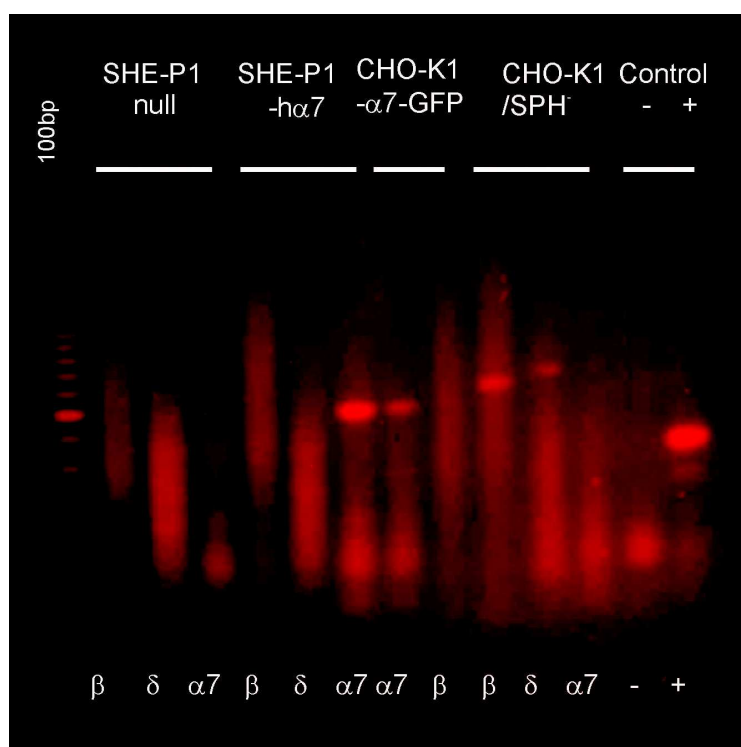


Figura 3.

RT-PCR del ARNm extraído de cada línea celular. Se determinó para el transcripto la presencia de distintas subunidades de AChR. Se sembraron iguales cantidades de ARNm en cada calle, a excepción de la primera donde se sembró un marcador de PM (100pb).

Como se aprecia en el gel de agarosa (Figura 3) sólo son positivas para la expresión del mRNA para $\alpha 7$ las líneas celulares CHO-K1- $\alpha 7$ -GFP y SHE-P1- $h\alpha 7$.

2) Expresión de la proteína $\alpha 7$ AChR

Detectada la presencia del ARNm en las células SHE-P1- $h\alpha 7$, procedimos a estudiar la expresión y la funcionalidad de la proteína receptora. Para ello marcamos las células SHE-P1- $h\alpha 7$ con α -BTX-Alexa Fluor⁴⁸⁸ (verde) a 4°C con el fin de detectar la expresión en membrana plasmática del AChR neural. A continuación, las mismas células se marcaron con α -BTX-Alexa Fluor⁵⁹⁴ (roja) luego de fijarlas con paraformaldehido 2% y permeabilizarlas con Triton X100 al 0,01%. No fue posible observar señal de toxina con fluoróforo verde, lo cual indicó que los niveles de expresión en membrana de receptores $\alpha 7$ son insuficientes para ser detectados por técnicas citoquímicas (Figura 4a). Sólo se pudo apreciar la presencia de los $\alpha 7$ AChR expresados en el interior celular (Figura 4b). Estudios adicionales de marcación intracelular y observación mediante microscopía confocal permitieron caracterizar la distribución intracelular del AChR marcado con α -BTX-Alexa Fluor⁴⁸⁸ (Figuras 4c y 4d).

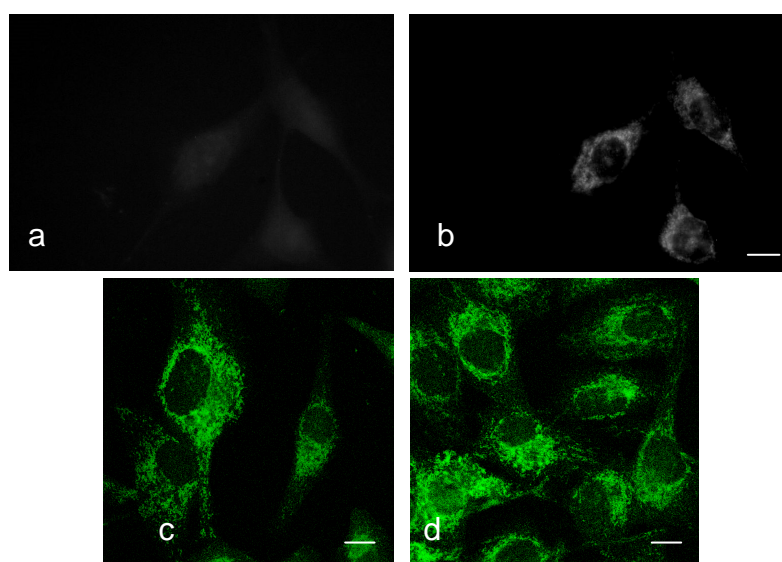


Figura 4

Expresión del $\alpha 7$ AChR en células SHE-P1- $h\alpha 7$. a) Marcación en superficie de células SHE-P1- $h\alpha 7$ y b, c y d) marcación intracelular del $\alpha 7$ AChR. Las fotografías (a) y (b) corresponden a microscopía de

epifluorescencia (objetivo de 40X, ver Materiales y Métodos). Las imágenes (c) y (d) corresponden a microscopía confocal. Escala 20 μm .

Dado que la distribución de los $\alpha 7$ AChR se observaba por el todo el citoplasma celular (Figura 4b, c y d) siguiendo un patrón típico de retículo endoplasmático (Baier y Barrantes, 2007; Roccamo y Barrantes, 2007) tratamos a las SHE-P1-h $\alpha 7$ con un marcador de retículo endoplasmático (*RE-tracker*) (azul) y con α -BTX-Alexa Fluor⁵⁹⁴ (roja) para verificar si la fluorescencia observada con el fluoróforo rojo colocalizaba con aquella de retículo (azul) (Figura 5).

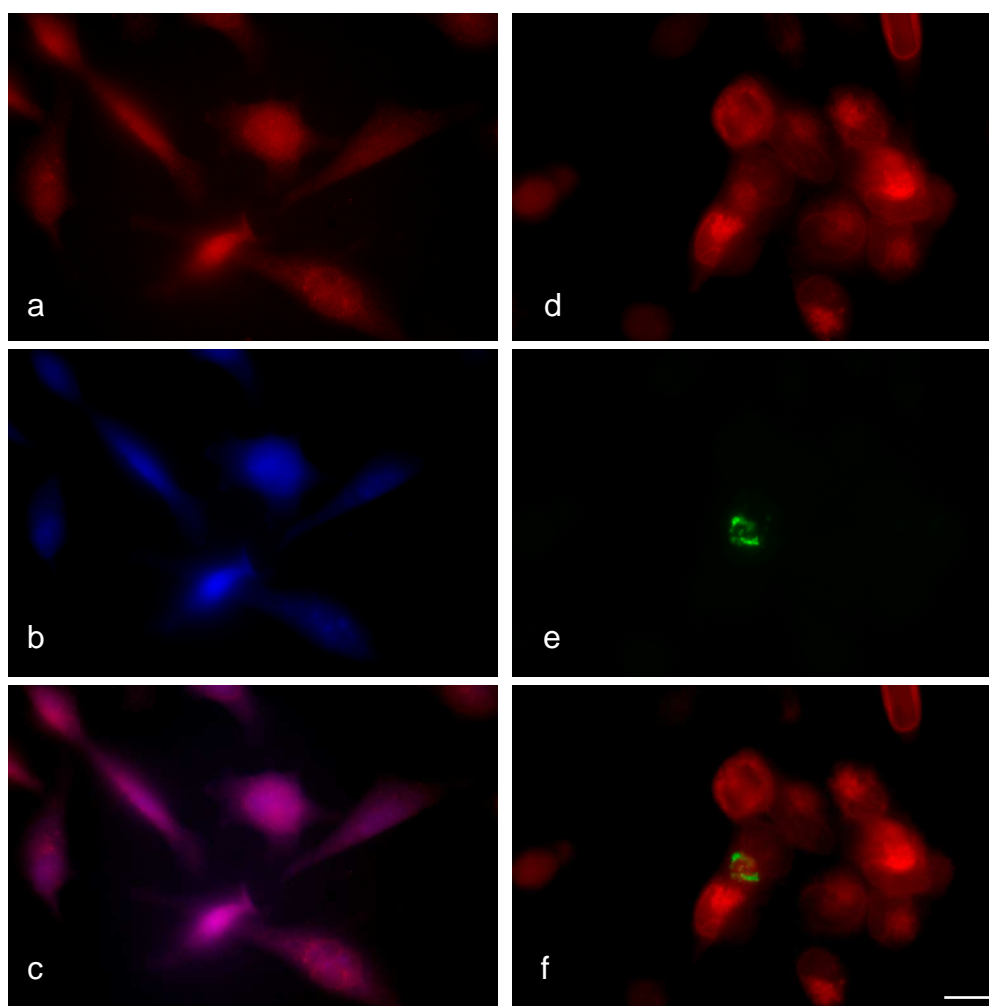


Figura 5.

Distribución de los $\alpha 7$ AChR en las células SHE-PI-h $\alpha 7$. (a) y (d) Marcación intracelular de los $\alpha 7$ AChRs. (b) marcación de retículo endoplasmático y (e) aparato de Golgi. (c) superposición de (a) y (b). (f) superposición de (d) y (e). Escala 20 μm

Efectivamente al superponer la imagen correspondiente a los $\alpha 7$ AChR con el marcador de retículo endoplasmático se observó una total co-localización. Más aun, tranfectamos luego a las células SHE-P1-h $\alpha 7$ con una proteína fluorescente verde marcadora de aparato de Golgi (Gal-T-GFP) y 48 hs más tarde verificamos que, en este caso, no se produjo colocalización con la marca intracelular correspondiente a los $\alpha 7$ AChRs (Figura 5f).

Según Schroeder et al. (2003), se puede lograr aumentar la expresión en la superficie de células SHE-P1-h $\alpha 7$ incubando las mismas por dos días a temperatura sub-fisiológica (25°C) o tratándolas con cicloheximida (0,5-2,0 $\mu\text{g/ml}$), un inhibidor de la síntesis proteica. Cuando tratamos de reproducir estos experimentos, incubando las células por 48 hs a 25°C, no obtuvimos ningún cambio en la expresión de los $\alpha 7$ AChR en la superficie celular (datos no mostrados).

Trabajos previos del grupo de Criado (2008) documentan que la proteína homóloga humana de Ric-3 aumenta la expresión de los receptores $\alpha 7$ nicotínicos en membrana de ovocitos de *Xenopus laevis* (Castillo et al., 2005). Por tal motivo, decidimos investigar si la expresión de esta proteína aumenta también la expresión del $\alpha 7$ AChR en la superficie celular en una línea celular de mamífero.

3) Expresión de la proteína Ric-3 humana en la línea celular SHE-P1-h $\alpha 7$

Con el objetivo de aumentar la expresión del $\alpha 7$ AChR en membrana plasmática, tranfectamos la línea celular SHE-P1-h $\alpha 7$ (Zhao et al., 2003) con el ADNc de la proteína humana Ric-3 contenida en el plásmido que también expresa resistencia al antibiótico G418 (ver Materiales y Métodos). A las 48 hs de realizada la tranfección se pudo visualizar por medio de técnicas citoquímicas la expresión del $\alpha 7$ AChR en la membrana celular.

Si bien este resultado de por sí constituyó un importante avance en el campo, dado que esta expresión sólo era de carácter transiente, decidimos obtener una línea celular que

expresara al $\alpha 7$ AChR neuronal en forma estable. Seleccionamos los clones positivos con el antibiótico de selección G418 (400 $\mu\text{g/ml}$). De esta manera se obtuvo en el laboratorio la línea celular SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3 (Figura 6) que expresa en forma estable el $\alpha 7$ AChR neuronal. Establecida la nueva línea celular, ésta se cultivó siempre en presencia del antibiótico de selección G418 (40 $\mu\text{g/ml}$).

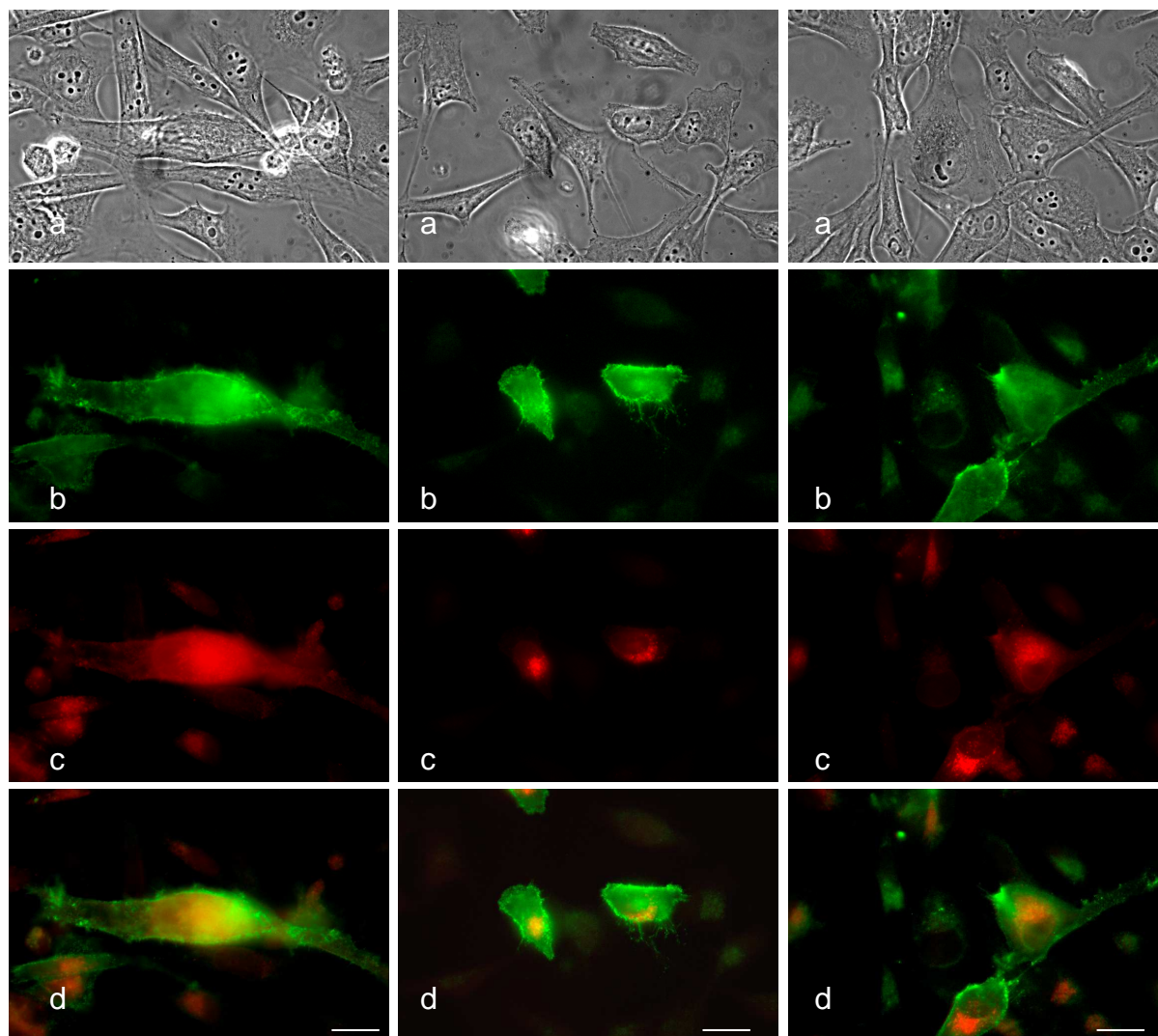


Figura 6.

Expresión del $\alpha 7$ AChR en células SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3. a) Contraste de fase. b) Marcación en superficie con α -bungarotoxina verde. c) Marcación intracelular con toxina roja d) Superposición de (b) y (c). Las fotografías se tomaron con un objetivo de 60X. Escala: 30 μm .

Con el objetivo de asegurarnos que la marcación de α -BTX-Alexa Fluor⁴⁸⁸ observada en las células SHE-P1-h α 7-Ric-3 por epifluorescencia correspondía efectivamente a la superficie celular, se marcaron las células con α -BTX-Alexa Fluor⁵⁹⁴ a 4°C y se examinaron mediante microscopía confocal. En la Figura 7 se evidencia que la marca correspondiente al α 7 AChR se encuentra localizada exclusivamente en la membrana celular.

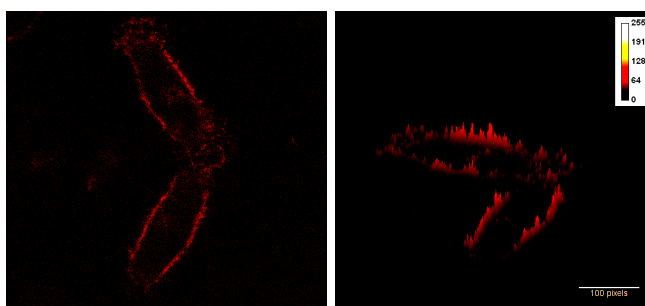


Figura 7.

Izquierda) Fotografía obtenida por microscopía confocal del α 7 AChR expresado en la superficie de la línea celular SHE-P1-h α 7-Ric-3. Derecha) Perfil de intensidad de la marcación observada en las SHE-P1-h α 7-Ric-3.

4) Caracterización de la expresión del α 7 AChR en la línea celular SHE-P1-h α 7-Ric-3.

Dada la marcada diferencia en la expresión en membrana del α 7 AChR en las células sin transfectar (Figura 4a) en comparación con aquella de la nueva línea celular SHE-P1-h α 7-Ric-3 (Figura 6b), decidimos realizar una cuantificación completa de la expresión del receptor subtipo α 7.

Se realizaron curvas de saturación con el antagonista competitivo α -BTX (ver Materiales y Métodos). Para ello, incubamos las células SHE-P1-h α 7-Ric-3 en presencia de concentraciones crecientes (0-100 nM) de α -BTX[¹²⁵I] a tiempo constante. El tiempo de incubación con el ligando radiactivo se fijó en 15 min, dado que en experimentos de fluorescencia durante ese período se obtuvo una excelente marcación del receptor de

superficie no sujeto a fenómenos de internalización (Figura 8). En todos los ensayos de unión de ligando radiactivo, los resultados expresan la ligazón específica frente al mismo ensayo realizado preincubando las muestras con 100 mM nicotina o 10 μ M α -BTX no radioactiva.

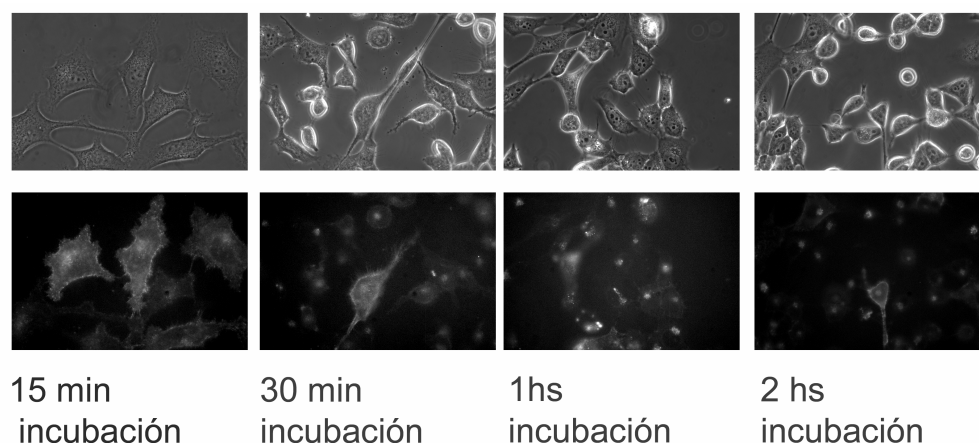


Figura 8.

Expresión del α 7 AChR en las células SHE-P1-h α 7-Ric-3. Se incubaron las células a los tiempos indicados con α -BTX-Alexa Fluor⁴⁸⁸. Panel superior, contraste de fase. Panel inferior, fotos con tinción de α -BTX- Alexa Fluor⁴⁸⁸.

Como se puede apreciar en la Figura 9, a medida que se aumenta la concentración de α -BTX[¹²⁵I] se registra un aumento en el número de cpm/mg de proteína. Se observa que el ligando satura los sitios receptores presentes en la superficie de las células SHE-P1-h α 7-Ric-3 en concentraciones que oscilan entre 100-150 nM α -BTX[¹²⁵I].

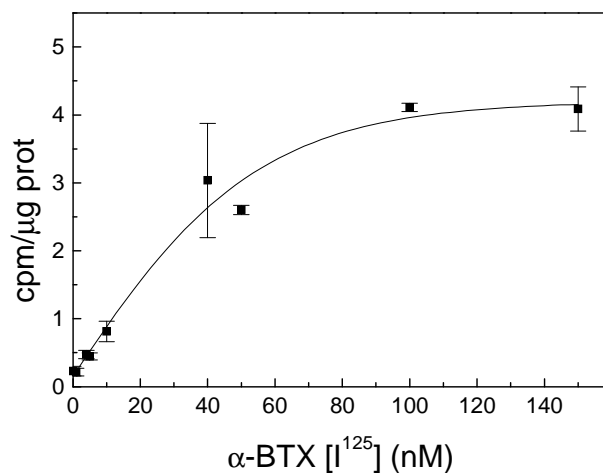


Figura 9.

El gráfico representa la unión de diferentes concentraciones de α -BTX[I¹²⁵] a los α 7 AChR de membrana celular. Cada punto es el promedio de por lo menos tres experimentos \pm D.E.

A partir de la curva de saturación realizamos la correspondiente transformada de Scatchard (Figura 10).

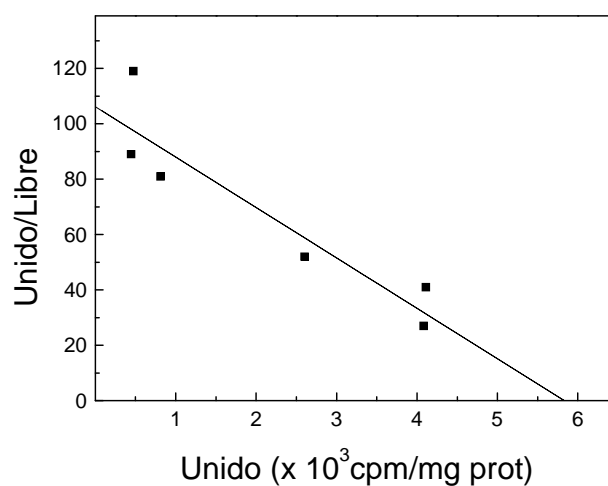


Figura 10.

El gráfico representa la transformada de Scatchard de los datos obtenidos en la Figura 9. Cada punto es el promedio de por lo menos tres experimentos \pm D.E.

Como se observa en la Figura 10, al graficar la cantidad de ligando unido/libre en función de α -BTX[I¹²⁵] unida, se obtiene una recta a partir de la cual se puede determinar la constante

de disociación para la α -BTX [125] del AChR (K_d), como la inversa de la pendiente negativa, es decir, $-1/\text{pendiente de la recta}$. De esta forma obtenemos $K_d = 54,9 \pm 9,2$ nM. También se puede determinar el máximo número de sitios de unión en la superficie de las SHE-P1-h α 7-Ric-3, B_{max} , en el punto en que la recta se intersecta con el eje x ($y=0$), que resultó ser de 233,19 fmoles/mg proteína.

5) Asociación del antagonista α -BTX al α 7 AChR expresado en células SHE-P1-h α 7-Ric-3

A continuación, se realizaron estudios cinéticos de asociación del ligando antagonista con el receptor α 7 AChR expresado en la superficie celular (Figura 11). Para tal fin, incubamos las células a distintos tiempos (0-30 min) frente a una concentración fija (40 nM) de α -BTX [125]. Al igual que lo observado en los experimentos de fluorescencia, se comprobó que la unión de α -BTX [125] era total a los 15 minutos de incubación. Se estableció un $t_{1/2}$ en 6,4 min, lo que indica una muy rápida asociación del ligando para el receptor α 7 expresado en esta línea celular.

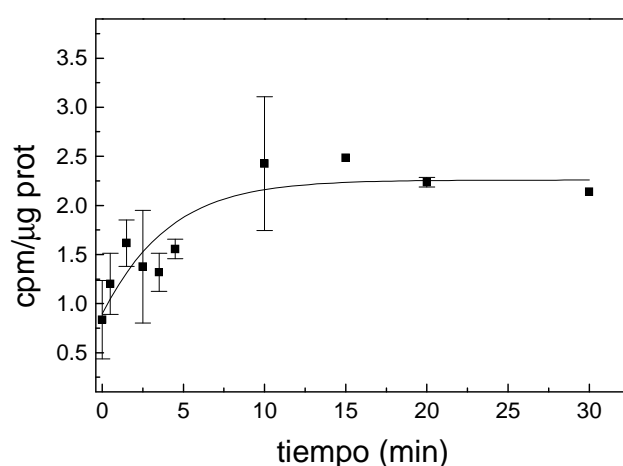


Figura 11.

El gráfico representa la cinética de asociación de α -BTX [125] a distintos tiempos de exposición. Cada punto es el promedio de por lo menos tres experimentos \pm D.E.

6) Disociación del antagonista α -BTX al $\alpha 7$ AChR expresado en células SHE-P1-h $\alpha 7$ -**Ric-3**

Una vez que se determinó la K_D y la velocidad de asociación de los receptores expuestos a α -BTX [125 I], se realizaron experimentos para determinar la velocidad de desaparición del $\alpha 7$ de la superficie celular. Para ello, luego de la incubación por 15 minutos de las células con α -BTX [125 I], se removió el ligando, prosiguiendo la incubación de las células con medio de cultivo fresco. Se determinó el porcentaje de la radioactividad remanente en las células a distintos tiempos (Gu et al., 1989), expresado como porcentaje de la radioactividad total (radioactividad en las células + radioactividad en el medio). Como se observa en la Figura 12, a medida que transcurre el tiempo luego de la incubación con α -BTX [125 I], se produce la disociación de la toxina de los AChRs. A los 20 minutos de iniciada la incubación en ausencia del ligando se produce un recambio metabólico de aproximadamente el 50% del $\alpha 7$ AChR de la superficie celular.

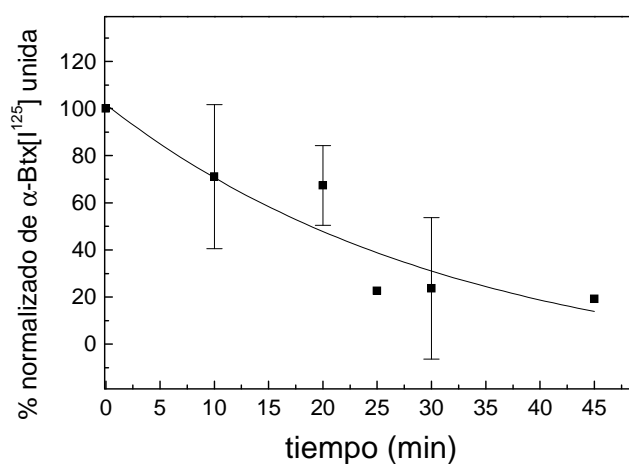


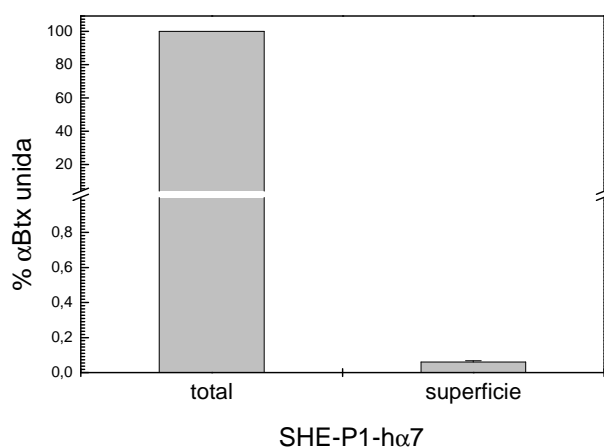
Figura 12.

El gráfico representa la disociación de la α -BTX [125 I] de los AChR en función del tiempo. Cada punto es el promedio de por lo menos tres experimentos \pm D.E.

7) Distribución de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ en células SHE-P1- $h\alpha 7$ y en las SHE-P1- $h\alpha 7$ -Ric-3

Por medio de estudios de unión de α -BTX[I^{125}] a los $\alpha 7$ AChR, cuantificamos cómo se distribuyen los mismos en las células SHE-P1- $h\alpha 7$ y en SHE-P1- $h\alpha 7$ -Ric-3. En células SHE-P1- $h\alpha 7$ sólo el $0,10 \pm 0,01$ % de los receptores $\alpha 7$ se encuentran expresados en la membrana celular, mientras que en las SHE-P1- $h\alpha 7$ -Ric-3 este porcentaje es del $24,64 \pm 2,33\%$ (Figura 13 a y b). Estos resultados concuerdan con lo observado por microscopía de fluorescencia (Figuras 4, 6 y 7).

a)



b)

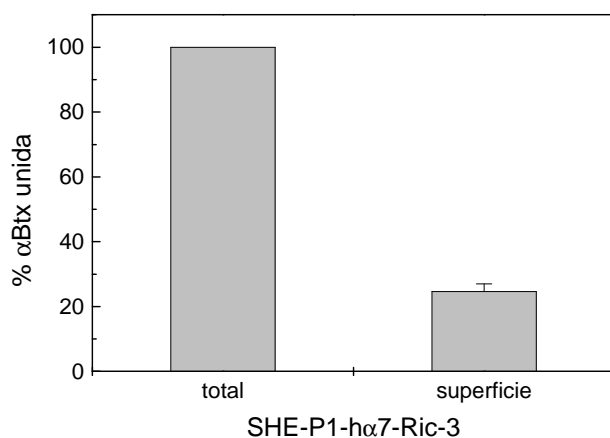


Figura 13.

Porcentaje de α -BTX[I^{125}] unida a los AChR en las células SHE-P1- $h\alpha 7$ y en SHE-P1- $h\alpha 7$ -Ric-3 en la superficie y en células permeabilizadas. Las barras representan el promedio de por lo menos tres experimentos \pm D.E. y están calculados con respecto al total de expresión.

8) Interacción de la nicotina con el $\alpha 7$ AChR expresado en células SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3

A continuación estudiamos la capacidad de la nicotina (Figura 14) para desplazar al antagonista α -BTX del sitio de unión de ACh (ver Materiales y Métodos).

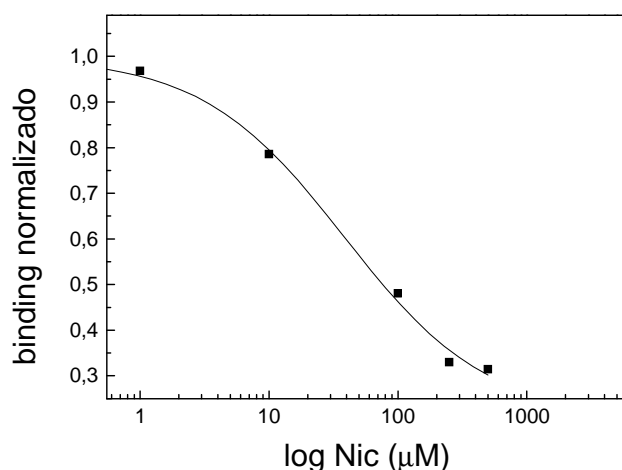


Figura 14.

Curva de competencia de la nicotina por el sitio de unión de la α -BTX[125] en el $\alpha 7$ AChR.

La IC_{50} para nicotina fue calculada en 38,34 μM .

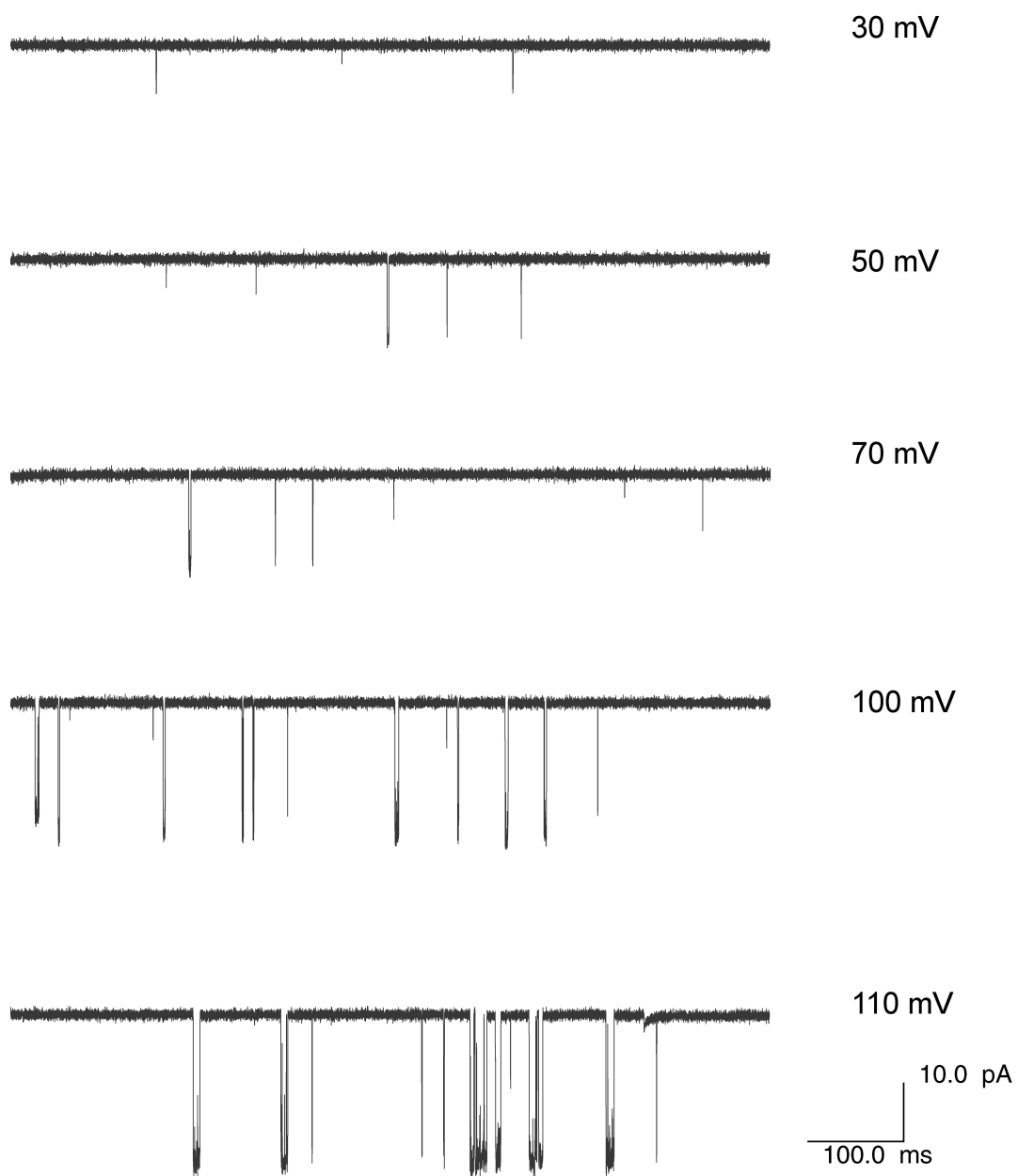
Este estudio nos indica que la nicotina y la bungarotoxina compiten por la unión al mismo sitio en la superficie del receptor.

9) Estudio de la cinética del $\alpha 7$ AChR expresado en células SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3

Por último determinamos si estos $\alpha 7$ AChR generaban corrientes al ser activados por el agonista ACh. Elegimos al agonista acetilcolina para realizar los estudios electrofisiológicos por ser el neurotransmisor endógeno y por ser el usado por Fucile et al. (2003), único trabajo en la literatura donde se registraron corrientes del $\alpha 7$ AChR a nivel de canal único expresado en la superficie de ovocitos.

Comenzamos exponiendo las células SHE-P1-h α 7-Ric-3 a 50 μ M ACh. En la Figura 15 se pueden apreciar los registros de las corrientes crudas generadas por la exposición de ACh al α 7 AChR a distintos potenciales.

a)



b)

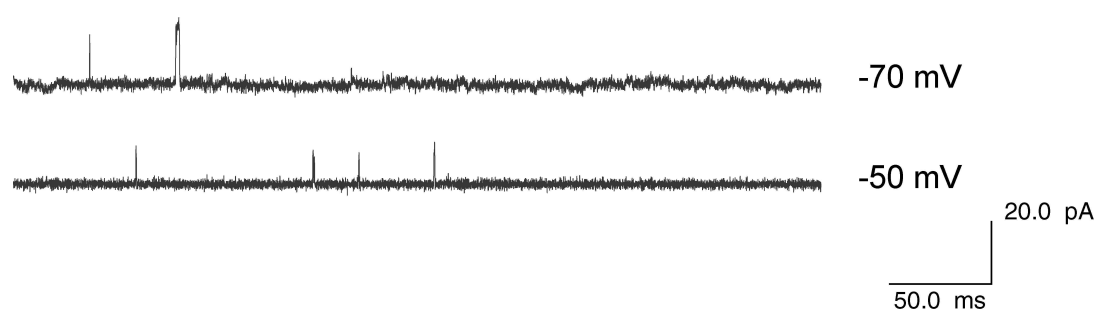


Figura 15.

Registros a nivel de canal único generados por la exposición de 50 μ M de ACh en células SHE-P1-h α 7-Ric-3 a potenciales de membrana a) positivos y b) negativos.

10) Caracterización del tiempo de estado abierto del receptor

Se continuó la caracterización electrofisiológica del α 7 AChR analizando el tiempo de estado abierto del receptor expuesto a 50 μ M de ACh (Figura 16). A +50 mV, se identificaron dos tiempos de estado abierto del canal. El de mayor duración fue de $0,42 \pm 0,07$ ms mientras que el segundo componente fue de $0,12 \pm 0,02$ ms ($n=11$). A -70 mV, se encontró un componente principal de $0,28 \pm 0,07$ ms y un segundo componente (de menor área) de $0,67 \pm 0,03$ ms ($n=3$).

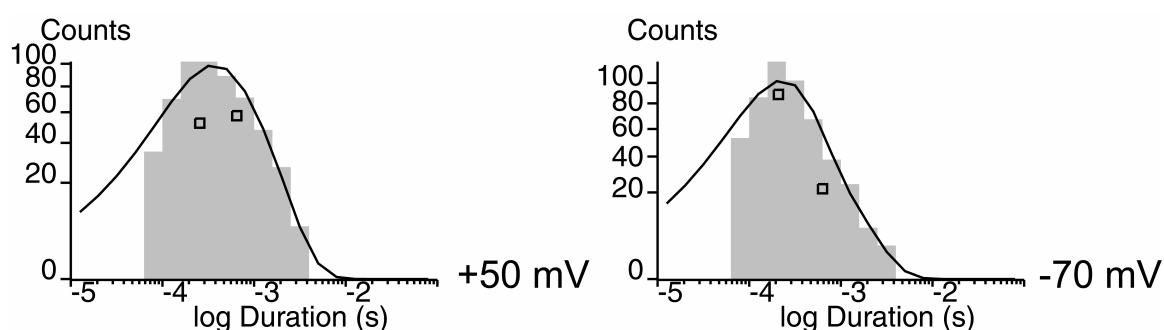


Figura 16.

Histogramas de tiempo de estado abierto de los α 7 AChRs expresados en membrana de las células SHE-P1-h α 7-Ric-3 a dos potenciales diferentes (+50 mV, izquierda; -70 mV, derecha).

11) Caracterización del tiempo de estado cerrado del receptor

En lo que respecta al tiempo que el canal permanece cerrado se observaron a +50 mV dos componentes en los histogramas construidos a partir del análisis de las corrientes generadas por la exposición a ACh. El primero de más corta duración ($0,17 \pm 0,09$ ms), seguramente se corresponde con cierres dentro de un mismo canal y el segundo componente más largo y variable (60 – 4000 ms) depende exclusivamente de la cantidad de canales presentes en el sello. A -70 mV se observaron de dos a tres componentes, siendo el más breve de $0,27 \pm 0,11$ ms de duración. Luego se observó un segundo componente mayoritario, de duración variable entre 10 -100 ms, y por último en un registro se observó un tercer componente de 2,26 s. Este último componente posiblemente se deba a los pocos canales observados en el mismo (Figura 17).

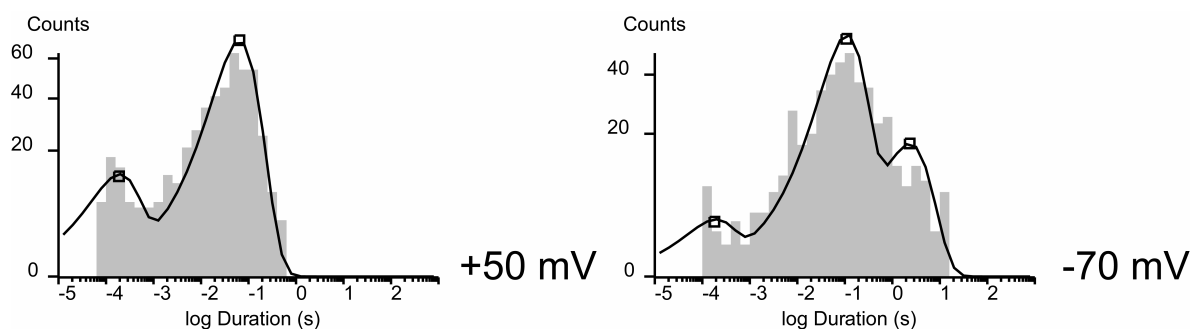


Figura 17.

Histogramas de tiempo de estado cerrado de los $\alpha 7$ AChRs expresados en membrana de las células SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3 a dos potenciales diferentes (+50 mV, izquierda; -70 mV, derecha).

12) Caracterización del tiempo de estallido del receptor

A continuación se estudió el tiempo de estallido o duración de los *bursts* luego de la exposición al agonista ACh. Al igual que en los capítulos anteriores, se definieron los estallidos del canal como una serie de eventos de aperturas de un AChR separadas por un tiempo crítico de cierre. A +50 mV, se registraron dos tiempos de *bursts*, el primero de $0,28 \pm 0,15$ ms y el segundo de $1,28 \pm 0,82$ ms de duración. A -70 mV los tiempos de *bursts* fueron de $0,26 \pm 0,13$ ms y de $0,90 \pm 0,33$ ms. En ambos casos, probablemente el

componente más breve refleje aperturas unitarias, mientras que el más largo se deba a aperturas producidas en grupos a esta concentración (Figura 18).

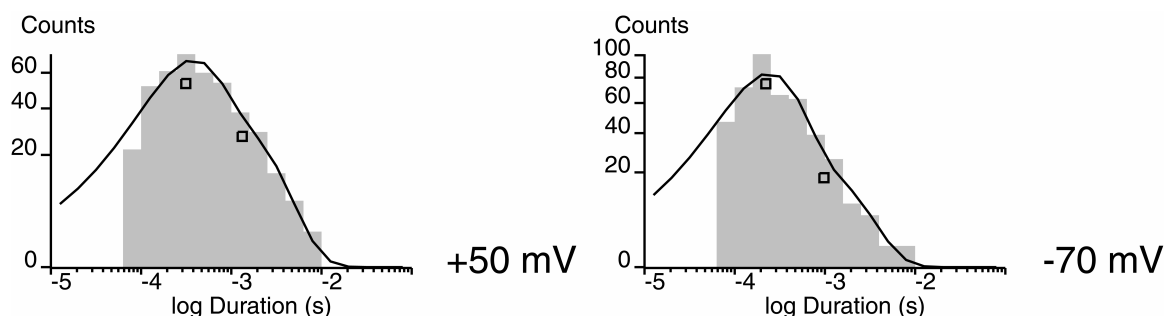


Figura 18.

Se muestran los histogramas de tiempo de estallido del canal a potenciales positivos y negativos de los $\alpha 7$ AChR expresados en células SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3.

13) Caracterización de la amplitud de las corrientes del receptor

A continuación, se analizaron las amplitudes de las corrientes generadas en presencia de ACh. A +50 mV, se detectaron dos amplitudes distintas: la menor fue de $5,72 \pm 1,61$ pA y la mayor fue de $10,72 \pm 1,29$ pA, siendo esta última la de mayor área (Figura 19). A -50 mV las corrientes detectadas fueron de $6,92 \pm 2,86$ pA y de $11,86 \pm 0,07$ pA siendo la distribución de sus áreas equivalentes (Figura 19).

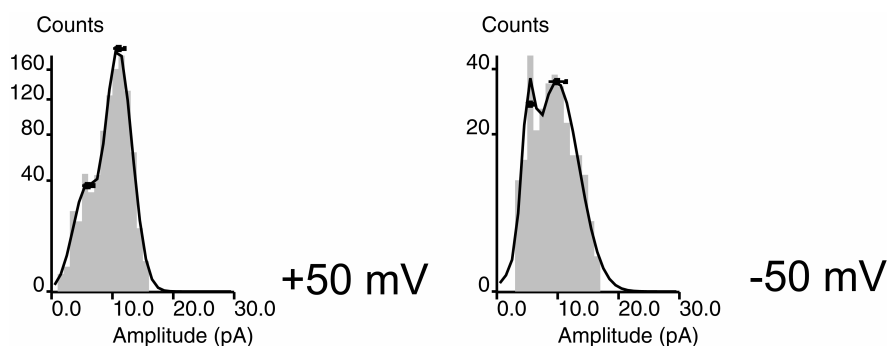


Figura 19.

Los histogramas representan la amplitud de las corrientes iónicas generadas por el $\alpha 7$ AChR a los potenciales de membrana indicados.

14) Variación de los parámetros cinéticos del $\alpha 7$ AChR en función del potencial de membrana aplicado

Con el objetivo de evaluar el efecto producido por los cambios en el potencial de membrana sobre el comportamiento del canal de $\alpha 7$ AChR, realizamos registros de canal único aplicando la concentración de $50 \mu\text{M}$ de ACh y variando el potencial de membrana de -100 mV a 100 mV.

Lo primero que observamos al aumentar el potencial de membrana aplicado, fue que la duración del componente principal correspondiente al tiempo de estado abierto del canal aumenta a potenciales hiperpolarizantes (Figura 20).

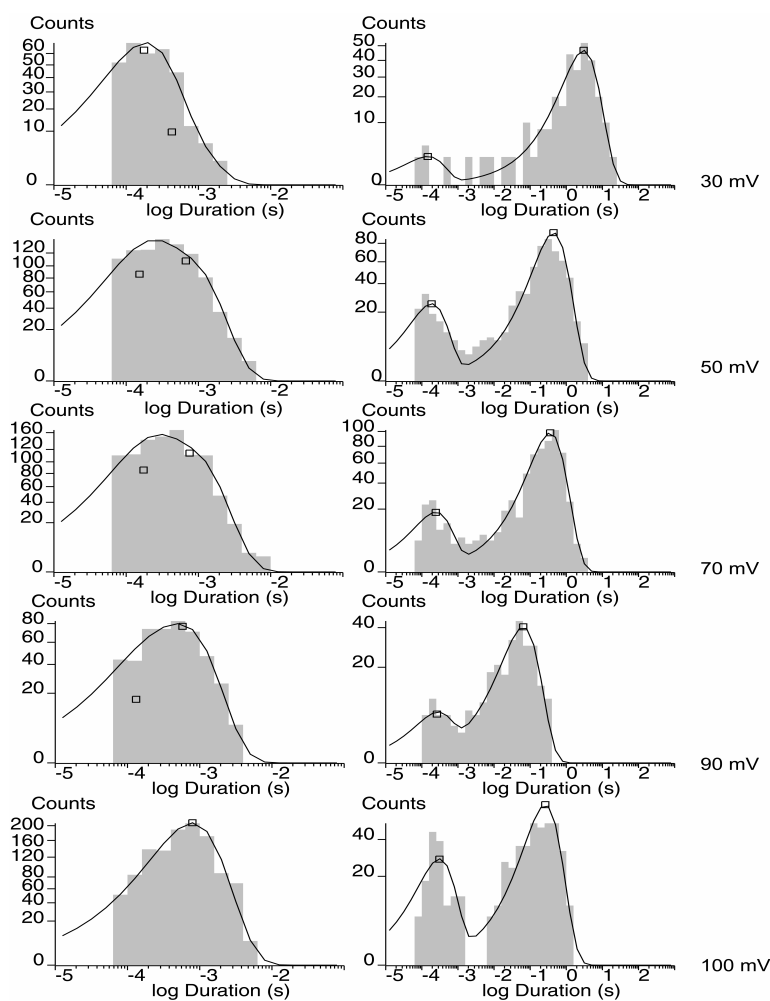


Figura 20.

Histogramas de tiempo de estado abierto (izquierda) y del tiempo de estado cerrado (derecha) del $\alpha 7$ AChR (ACh $50 \mu\text{M}$).

En cuanto al tiempo de estado cerrado del $\alpha 7$ AChR expresado en la superficie de las SHE-P1-h $\alpha 7$ -Ric-3, a potenciales positivos se observan dos componentes principales. Uno cuya duración permanece constante y corresponde a cierres dentro de un mismo canal y otro más largo y variable que depende de la cantidad de canales presentes en el sello. A partir de este último se puede inferir si se produce desensibilización por exposición a agonistas. Para eliminar la variabilidad entre registros, debido al número de canales en el sello, evaluamos en un único sello el componente más largo en duración de permanencia en el estado cerrado (Figura 21).

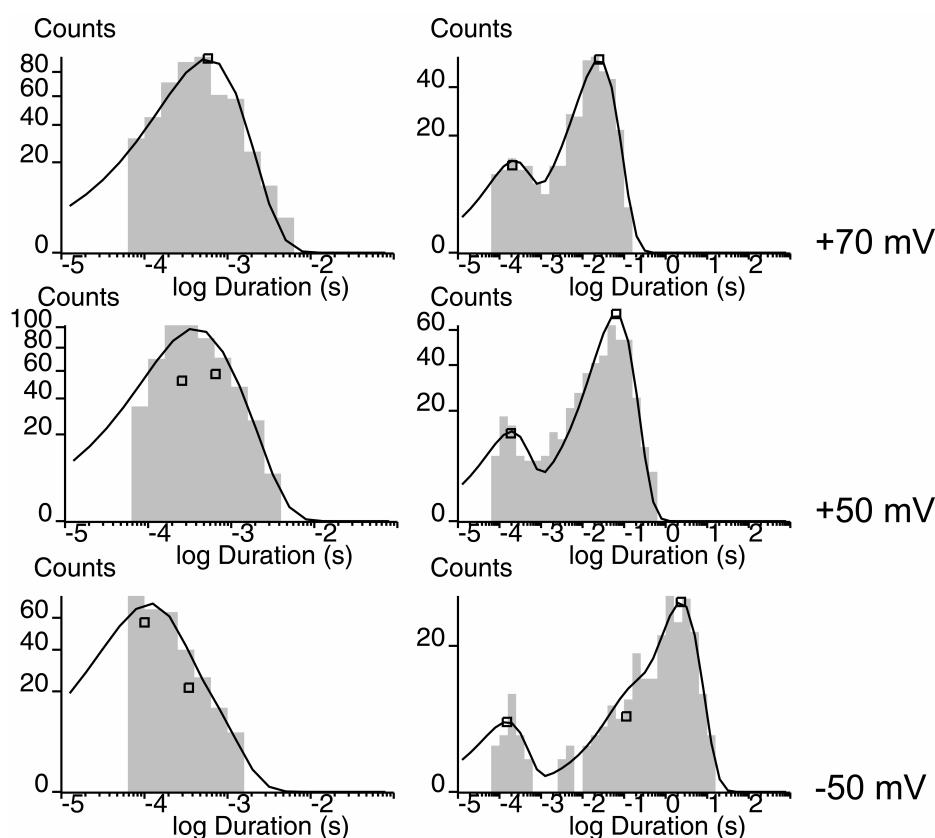


Figura 21.

Histogramas de tiempo de estado abierto (izquierda) y cerrado (derecha) del $\alpha 7$ AChR en función del potencial aplicado. Los histogramas se construyeron luego del análisis de los registros crudos obtenidos luego de la exposición a 50 μM ACh.

Pudimos determinar que éste componente era más breve a medida que la hiperpolarización de la membrana era mayor (Figura 21). A potenciales negativos, en ocasiones, se observó

la presencia de un nuevo componente de un orden de magnitud mayor al más largo observado a potenciales positivos. Muy probablemente este componente refleje la gran desensibilización que sufre el canal a potenciales negativos (Figura 21).

En cuanto a la duración de los estallidos del canal (Figura 22) se observó que al aumentar el potencial de la membrana se producía un marcado aumento del tiempo más largo de los mismos (τ_{burst2}) mientras que el componente más breve no sufrió cambios con la variación del voltaje aplicado a la membrana (τ_{burst1}).

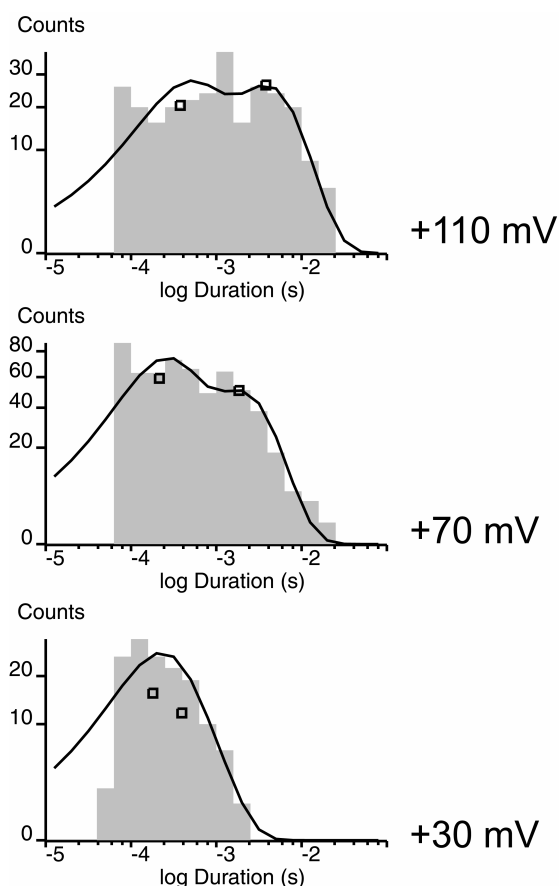


Figura 22.

Se analizó el tiempo de estallido del canal en función del potencial de membrana aplicado. Se muestran los histogramas de tiempos de *bursts* a distintos potenciales de membrana positivos.

En lo que concierne a las amplitudes de las corrientes generadas en presencia de ACh, como era de esperar se observó (Figura 23) que a medida que las células se hiperpolarizan o se despolarizan, aumentan las amplitudes de las corrientes de iones que atraviesan el canal nicotínico.

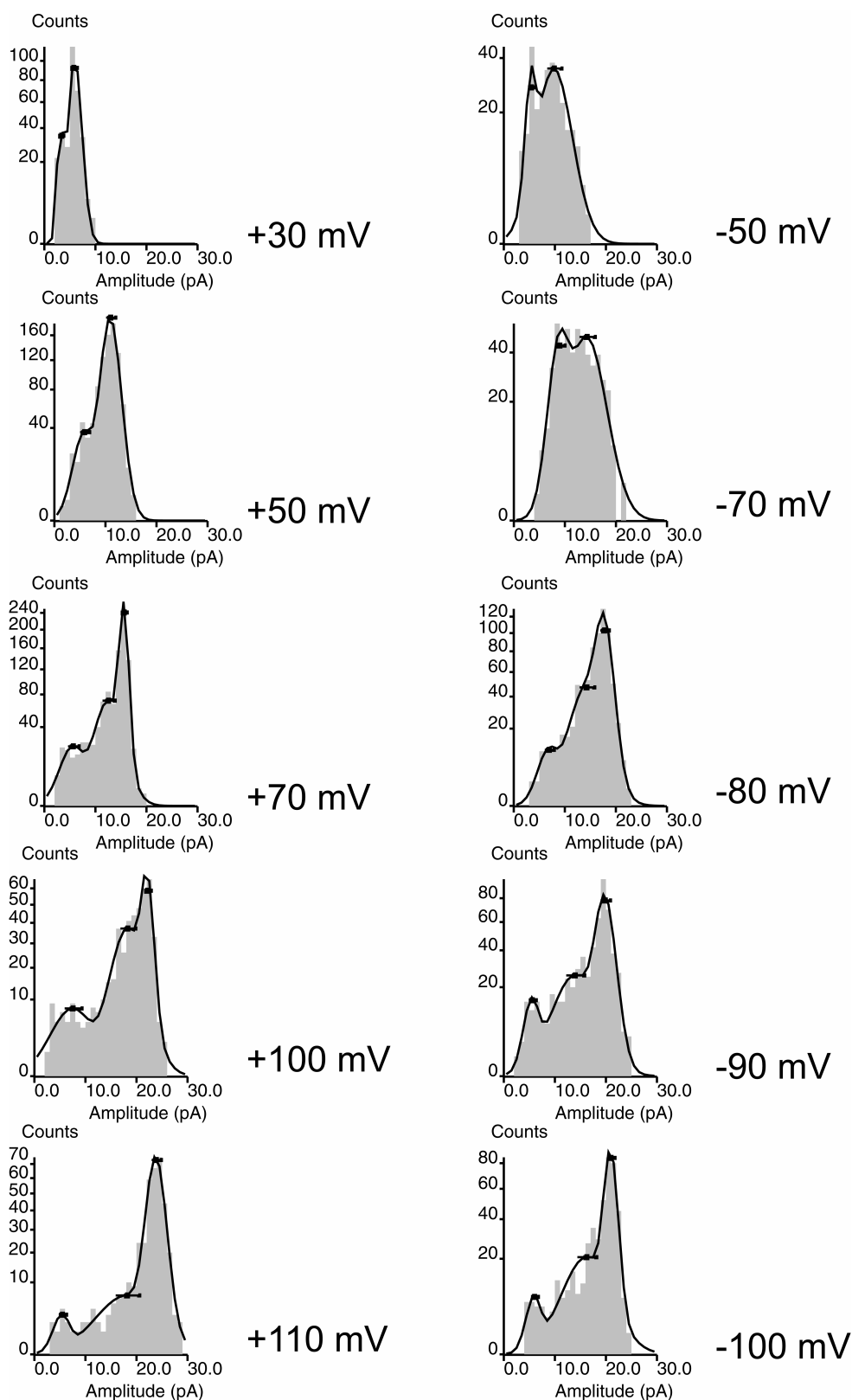


Figura 23.

Cambios en la amplitud de las corrientes en función del potencial de membrana aplicado. Los histogramas representan la amplitud de las corrientes de iones generadas por el $\alpha 7$ AChR luego de la exposición a $50 \mu\text{M}$ de ACh en función del potencial de membrana aplicado.

Discusión

Dadas las controversias acerca de las fluctuaciones en los niveles de expresión de los receptores $\alpha 7$ expresados en células SHE-P1-h $\alpha 7$ (Zhao et al., 2003) comenzamos este Capítulo de Tesis doctoral evaluando la expresión endógena del ARNm de la subunidad $\alpha 7$ en células SHE-P1-h $\alpha 7$. Determinamos que efectivamente las células SHE-P1-h $\alpha 7$ poseen el ARNm para la subunidad $\alpha 7$, a diferencia de sus progenitoras las SHE-P1 salvajes. Además, esta línea celular carece de otras subunidades de AChR como se demostrara en la Figura 3.

A partir de esta línea celular, las SHE-P1-h $\alpha 7$, realizamos experimentos electrofisiológicos para intentar la detección del fenómeno de activación de los $\alpha 7$ AChR, pero no obtuvimos respuesta alguna al exponer las células en la configuración *cell-attached* a diferentes concentraciones de ACh (datos no mostrados). Esta serie de experimentos proveyó la primera evidencia acerca de la carencia de expresión en superficie del AChR en esta línea celular.

A continuación, y con el propósito de visualizar la expresión en membrana plasmática del $\alpha 7$ AChR, realizamos experimentos exponiendo las células a α -BTX–Alexa Fluor^{488/594} a 4°C. En concordancia con los resultados aludidos en el párrafo anterior, no se observó marcación alguna del receptor en la superficie celular. Sin embargo, al permeabilizar las células con Triton X100 pudimos ver que la α -BTX–Alexa Fluor⁵⁹⁴ marcaba todo el interior celular y más específicamente la región del retículo endoplasmático. En este punto nos encontrábamos en presencia de una línea celular que no sólo expresaba el ARNm del $\alpha 7$ AChR sino que también sintetizaba la subunidad $\alpha 7$ del receptor; no obstante, por algún motivo el transporte a la superficie celular no se llevaba a cabo.

Intentamos a continuación aumentar el nivel de expresión en membrana del $\alpha 7$ AChR recurriendo a varias estrategias biológicas como re-transfectar las células en forma transiente con la subunidad $\alpha 7$, promover la inducción del aumento de la expresión por

tratamiento de las células con nicotina durante 48 hs, o por medio de incubaciones durante 48 hs a 25 °C (Schroeder et al., 2003). Sin embargo, estas estrategias no lograron aumentar la expresión en membrana a niveles detectables.

Por medio de estudios de unión de α -BTX[I¹²⁵] a los α 7 AChR finalmente comprobamos que menos del 1% de los receptores se hallaban en la membrana celular de las células SHE-P1-h α 7. La retención del α 7 AChR en el interior celular podría obedecer a deficiencias en el ensamblado del mismo. Varios estudios realizados en el AChR muscular describen que cuando la subunidad α no se ensambla con el resto de las subunidades que forman el receptor, no logra ser transportada a la membrana plasmática y queda retenida en el interior celular (Blount y Merlie, 1988; Wang et al., 2002). Sin embargo, la subunidad α desensamblada es capaz de unir α -BTX (Smith et al., 1987). Por esta razón, no es posible distinguir a los AChR intracelulares de las subunidades α mediante las técnicas utilizadas por unión de α -BTX-Alexa Fluor^{488/594} o α -BTX[I¹²⁵]. Una vez ensamblados como pentámeros sólo son capaces de comenzar el tráfico desde el retículo endoplasmático hacia la superficie celular (Smith et al., 1987; Gu et al., 1989; Ross et al., 1991; Gelman et al., 1995). La presencia de proteínas chaperonas en el retículo y señales específicas en las subunidades del AChR son las responsables de regular este proceso (Wang et al., 2002; ver revisión en Wanamaker et al., 2003).

Al marcar a las células SHE-P1-h α 7 con α -BTX-Alexa Fluor^{488/594} previamente fijadas y permeabilizadas (Figura 4), observamos una distribución de la fluorescencia en todo el citoplasma, siguiendo el patrón característico de los marcadores de retículo endoplasmático (Baier y Barrantes, 2007; Roccamo y Barrantes, 2007). Al tranfectar las células con la proteína Gal-T-GFP, no observamos colocalización entre la marca correspondiente al aparato de Golgi y el α 7 AChR. Estos experimentos nos permitieron verificar que el α 7 AChR expresado en la línea celular SHE-P1-h α 7 no llegaba al aparato de Golgi, en niveles detectables, luego de su síntesis. Por este motivo, decidimos tranfectar entonces las células SHE-P1-h α 7 con la proteína Ric-3. Esta proteína es requerida para la maduración de los

AChR en *Caenorhabditis elegans*. Se ha reportado que la proteína homóloga humana de Ric-3 aumenta la expresión de los receptores $\alpha 7$ nicotínicos en ovocitos de *Xenopus laevis* (Castillo et al., 2005). Esta proteína sería necesaria para lograr el correcto plegado y/o ensamblado del $\alpha 7$ AChR, y de esta manera lograr la expresión de receptores funcionales (Williams et al., 2005) en membrana plasmática.

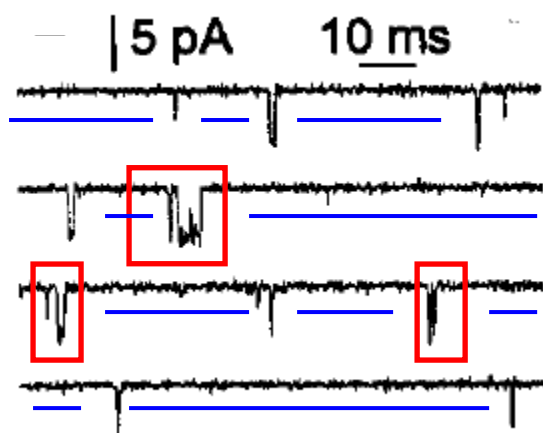
Efectivamente, a las 48 hs de tranfectar el plásmido de la proteína Ric-3 en las células SHE-P1- $\alpha 7$ pudimos observar por técnicas citoquímicas un aumento de la expresión en membrana del $\alpha 7$ AChR. Dado que esta expresión era transiente decidimos obtener una línea celular que expresara al receptor neural $\alpha 7$ en forma permanente. Para ello, seleccionamos los clones positivos con el antibiótico de selección G418 y obtuvimos una línea celular capaz de expresar en membrana plasmática al receptor neural $\alpha 7$ en forma estable (Figuras 6 y 7). Esta transfección modificó en forma significativa la expresión del $\alpha 7$ AChR en membrana.

Es interesante destacar que tan sólo fue necesario llevar a cabo la marcación de los $\alpha 7$ AChR con la toxina α -BTX-Alexa Fluor⁴⁸⁸ por el lapso de 15 min para obtener una buena señal en membrana (Figura 8). A tiempos mayores que 15 min se observó una clara internalización de los AChRs. Los estudios de ligazón con α -BTX[¹²⁵I] determinaron que la expresión en membrana de los $\alpha 7$ AChR es de un 25% del total de receptores presentes en esta nueva línea celular (Figura 13). Por ensayos de fluorescencia y de unión con α -BTX[¹²⁵I] comprobamos que las velocidades de asociación (Figura 11) de la α -BTX son muy rápidas (en el orden de minutos). Además, hemos también comprobado que el recambio o “*turn over*” del $\alpha 7$ AChR es muy rápido y oscila en el orden de pocos minutos (Figura 12). Estas serían diferencias importantes con respecto a las de la expresión del AChR muscular, el cual describe una cinética de asociación con α -BTX más lenta que el $\alpha 7$ AChR. Este último presenta además un recambio metabólico mayor. Al realizar un análisis matemático del gráfico de Scatchard construido a partir de los datos obtenidos en la Figura 9, ajustamos los puntos obtenidos con una única recta (Figura 10). A partir de ésta calculamos una K_d =

55 nM y un máximo número de sitios de unión de 233 fmoles/mg de proteínas. Cabe destacar que al aumentar la concentración de ligando, la α -BTX[I^{125}], también aumenta la probabilidad de encontrar al receptor con el máximo de sitios de unión ocupados. Dado que el receptor homomérico presenta cinco interfases idénticas para la unión del ligando, los sitios de unión pueden ser hasta cinco.

Los cambios en la expresión del $\alpha 7$ AChR no modificaron sus propiedades farmacológicas ya que se determinó por ensayos de ligazón un $EC_{50} \sim 40 \mu M$ para Nicotina (Figura 14), lo cual concuerda con datos bibliográficos (Peng et al., 1994).

Los estudios electrofisiológicos también demostraron que los $\alpha 7$ AChR responden a ACh generando corrientes de canal único (Figura 15). Tomamos como referencia los parámetros cinéticos obtenidos por Fucile et al. (2002), quienes describen corrientes a nivel de canal único del $\alpha 7$ AChR en ovocitos. En ese trabajo, ellos muestran que los ovocitos expuestos a $50 \mu M$ de ACh, exhiben un tiempo de estado abierto promedio de $0,56 \pm 0,02$ ms a potenciales depolarizantes (negativos). A -70 mV, nosotros comprobamos la presencia de dos tiempos de estado abierto del $\alpha 7$ AChR. $\tau_{open1} = 0,28 \pm 0,07$ ms y $\tau_{open2} = 0,67 \pm 0,03$ ms siendo el primero el de mayor área en el análisis de los histogramas (Figura 16). Estos valores se encuentran muy próximos a los hallados por el grupo de Eusebi. En lo que respecta al tiempo de estado cerrado de los $\alpha 7$ AChRs los autores describen un único componente de tiempo de estado cerrado mientras que nosotros encontramos por lo menos dos. Sin embargo, con sólo observar el registro que ellos presentan como representativo de los canales obtenidos frente a la exposición a $50 \mu M$ de ACh se pueden observar también dos tiempos de estado cerrado.



En azul se marca τ_{close2} mientras que los recuadros en rojo pretenden mostrar los cierres breves correspondientes a τ_{close1} que se producen dentro de un mismo canal abierto. Extraído y modificado de Fucile et al. (2002).

Esto demuestra que las diferencias encontradas entre nuestros registros y los reportados por Fucile y colaboradores se deben a la forma en que los datos crudos fueron analizados. En lo que respecta a las amplitudes de las corrientes generadas luego de la exposición al agonista, los autores de ese trabajo encuentran dos niveles de conductancia. Del análisis de los registros presentados en este Capítulo, y en coincidencia con ellos, reconocemos entre dos y tres niveles de corriente (dependiendo del potencial aplicado).

En cuanto a la no rectificación de las corrientes generadas por ACh a potenciales positivos, una posible explicación podría ser la generación de corrientes de cloro activadas como consecuencia de la entrada de calcio a las células por la apertura de los $\alpha7$ AChR (Peng et al., 1994). Sin embargo, la generación de estas corrientes sigue siendo consecuencia de la apertura del canal luego de ser expuesto al agonista. Por tanto, el $\alpha7$ AChR expresado en las SHE-P1-h $\alpha7$ -Ric-3 es un receptor funcional.

De esta manera, concluimos que la nueva línea celular creada en el laboratorio constituye una excelente herramienta para el estudio de las propiedades del $\alpha7$ AChR humano.

Conclusiones finales

Conclusiones finales

En el Capítulo 1 de esta Tesis comprobamos que el anticonvulsivo LTG interactúa con el AChR como un INC de tipo bloqueador de canal abierto.

Además, observamos que la presencia de LTG en el medio de cultivo protege a las células CHO-K1/A5 de la muerte celular frente a un estímulo nocivo, como es la ausencia de suero en los medios de cultivo. En cambio, las células parentales CHO-K1, que carecen de AChR, no se beneficiaron de tal protección.

Estos resultados sugieren que la droga LTG ejerce algún otro tipo de efecto sobre los AChRs. Efectivamente en el Capítulo 2 comprobamos que la LTG es también un activador del AChR. Realizamos entonces una completa caracterización de la activación de los AChRs por el anticonvulsivo.

Finalmente en el Capítulo 3 de esta Tesis doctoral, creamos una línea celular de mamífero (SHE-P1-h α 7-Ric-3) la cual expresa en membrana plasmática al receptor de acetilcolina nicotínico neuronal α 7 humano. Con esta nueva herramienta celular realizamos estudios farmacológicos y electrofisiológicos para caracterizarla.

Bibliografía

Bibliografía

1. Abramson SN, Li Y, Culver P, Taylor P. An analog of lophotoxin reacts covalently with Tyr190 in the alpha-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 1989 Jul 25; 264(21):12666-72.
2. Adams PR. Drug blockade of open end-plate channels. *J Physiol.* 1976 Sep; 260(3):531-52.
3. Adams PR. Voltage jump analysis of procaine action at frog end-plate. *J Physiol.* 1977 Jun; 268(2):291-318.
4. Akk G, Steinbach JH, Galantamine activates muscle-type nicotinic acetylcholine receptors without binding to the acetylcholine-binding site. *J Neurosci.* 2005 Feb 23;25(8):1992-2001
5. Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Trends in Pharmacological Sciences-Tips Nomenclature Supplement (2001).
6. Amador M, Dani JA. MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptor channels.. *Synapse.* 1991 Mar;7(3):207-15.
7. Anderson GD. A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. *Ann Pharmacother.* 1998 May; 32(5):554-63
8. Auerbach A, Akk G, Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism, *J. Gen. Physiol.* 112 (1998) 181–197.
9. Baier CJ, Barrantes FJ. Sphingolipids are necessary for nicotinic acetylcholine receptor export in the early secretory pathway. *J Neurochem.* 2007 May;101(4):1072-84.
10. Barrantes FJ. Molecular pathology of the acetylcholine receptor. In: *The nicotinic acetylcholine receptor: Current views and future trends.* Neuroscience Intelligence Unit Springer Verlag, Berlin/Heidelberg and Landes Publishing Co., Georgetown, TX 1998, pp. 175-212.
11. Barrantes FJ. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function through the outer and middle rings of transmembrane domains. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2003 Sep; 6(5):620-32.
12. Beran RG, Sheehan K, Tilley MI. Routine use of lamotrigine, a new anti-epileptic medication, and the value of measuring its blood levels. *Clin Exp Neurol.* 1994; 31:61-7.
13. Blanton MP, Cohen JB. Mapping the lipid-exposed regions in the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry.* 1992 Apr 21;31(15):3738-50.

14. Blanton MP, Cohen JB. Identifying the lipid-protein interface of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry*. 1994 Mar 15;33(10):2859-72.
15. Blount P, Merlie JP. Native folding of an acetylcholine receptor alpha subunit expressed in the absence of other receptor subunits. *J Biol Chem*. 1988 Jan 15; 263(2):1072-80.
16. Blount P, Merlie JP. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*. 1989 Sep; 3(3):349-57.
17. Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol*. 1987 Apr; 385:243-86.
18. Boulter J, Connolly J, Deneris E, Goldman D, Heinemann S, Patrick J. Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov; 84(21):7763-7.
19. Boulter J, Evans K, Goldman D, Martin G, Treco D, Heinemann S, Patrick J. Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *Nature*. 1986 Jan 30-Feb 5; 319(6052):368-74.
20. Bouzat C. Ephedrine blocks wild-type and long-lived mutant acetylcholine receptor channels. *Neuroreport*. 1996 Dec 20; 8(1):317-21.
21. Bouzat C, Barrantes FJ. Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoid hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade. *J Biol Chem*. 1996 Oct 18; 271(42):25835-41.
22. Bouzat C, Barrantes F, Sine S. Nicotinic receptor fourth transmembrane domain: hydrogen bonding by conserved threonine contributes to channel gating kinetics. *J Gen Physiol*. 2000 May; 115(5):663-72.
23. Bouzat C, Bren N, Sine SM. Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron*. 1994 Dec; 13(6):1395-402.
24. Boyd ND, Cohen JB. Desensitization of membrane-bound Torpedo acetylcholine receptor by amine noncompetitive antagonists and aliphatic alcohols: studies of [3H] acetylcholine binding and 22Na⁺ ion fluxes. *Biochemistry*. 1984 Aug 28;23(18):4023-33.
25. Bren N, Sine SM. Hydrophobic pairwise interactions stabilize alpha-conotoxin M1 in the muscle acetylcholine receptor binding site. *J Biol Chem*. 2000 Apr 28; 275(17):12692-700.
26. Bren N, Sine SM. Identification of residues in the adult nicotinic acetylcholine receptor that confer selectivity for curariform antagonists. *J Biol Chem*. 1997 Dec 5; 272(49):30793-8.

27. Cachelin AB, Colquhoun D, Desensitization of the acetylcholine receptor of frog end-plates measured in a Vaseline-gap voltage clamp, *J. Physiol.* (1989) 159–188.
28. Castelán F, Castillo M, Mulet J, Sala S, Sala F, Domínguez Del Toro E, Criado M. Molecular characterization and localization of the RIC-3 protein, an effector of nicotinic acetylcholine receptor expression. *J Neurochem.* 2008 May; 105(3):617-27.
29. Castillo M, Mulet J, Gutiérrez LM, Ortiz JA, Castelán F, Gerber S, Sala S, Sala F, Criado M. Dual role of the RIC-3 protein in trafficking of serotonin and nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 2005 Jul 22; 280(29):27062-8. Epub 2005 May 31.
30. Catterall WA. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels.
31. *Physiol Rev.* 1992 Oct;72(4 Suppl):S15-48.
32. Changeux JP. Thudichum Medal Lecture. The acetylcholine receptor: a model for allosteric membrane proteins. *Biochem Soc Trans.* 1995 May; 23(2):195-205.
33. Changeux JP, Edelstein SJ. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron.* 1998 Nov; 21(5):959-80.
34. Changeux JP, Nicotinic Acetylcholine Receptors: from Molecular biology to Cognition, In: Odile Jacob (Ed.), 2005, New York.
35. Changeux JP, Devillers-Thierry A, Chemouilli P, Acetylcholine receptor: an allosteric protein, *Science* 225 (1985) 1335–1345.
36. Cheung H, Kamp D, Harris E. An in vitro investigation of the action of lamotrigine on neuronal voltage-activated sodium channels. *Epilepsy Res.* 1992 Nov; 13(2):107-12
37. Chiara DC, Middleton RE, Cohen JB. Identification of tryptophan 55 as the primary site of [3H] nicotine photoincorporation in the gamma-subunit of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* 1998 Feb 20; 423(2):223-6.
38. Colquhoun D, Hawkes AG. On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and of clusters of bursts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1982 Dec 24;300(1098):1-59
39. Colquhoun D, Ogden DC. Activation of ion channels in the frog end-plate by high concentrations of acetylcholine. *J Physiol.* 1988 Jan; 395:131-59.
40. Copeland RL Jr, Das JR, Kanaan YM, Taylor RE, Tizabi Y. Antiapoptotic effects of nicotine in its protection against salsolinol-induced cytotoxicity. *Neurotox Res.* 2007 Jul; 12(1):61-9.
41. Cooke JP. Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor. *Life Sci.* 2007 May 30;80(24-25):2347-51.

42. Cooper ST, Millar NS. Host cell-specific folding and assembly of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit. *J Neurochem.* 1997 May; 68(5):2140-51.
43. Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40:431-58.
44. Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron.* 1990 Dec; 5(6):847-56.
45. Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF. A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn²⁺. *J Biol Chem.* 2003 Jan 10; 278(2):712-7.
46. Dilger JP, Brett RS. Actions of volatile anesthetics and alcohols on cholinergic receptor channels.. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 625:616-27.
47. Dilger JP, Liu Y. Desensitization of acetylcholine receptors in BC3H-1 cells. *Pflugers Arch.* 1992 Apr; 420(5-6):479-85.
48. Dilger JP, Boguslavsky R, Barann M, Katz T, Vidal AM. Mechanisms of barbiturate inhibition of acetylcholine receptor channels. *J Gen Physiol.* 1997 Mar;109(3):401-14.
49. Drisdell RC, Manzana E, Green WN. The role of palmitoylation in functional expression of nicotinic alpha7 receptors. *J Neurosci.* 2004 Nov 17; 24(46):10502-10.
50. Dwyer TM, Adams DJ, Hille B. The permeability of the endplate channel to organic cations in frog muscle. *J Gen Physiol.* 1980 May; 75(5):469-92.
51. Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Mar;29(3):151-8.
52. Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 13;98 (6):3501-6.
53. Engel AG, Ohno K, Sine SM. The spectrum of congenital myasthenic syndromes. *Mol Neurobiol.* 2002 Oct-Dec; 26(2-3):347-67.
54. Fatima-Shad K, Barry PH. Anion permeation in GABA- and glycine-gated channels of mammalian cultured hippocampal neurons. *Proc Biol Sci.* 1993 Jul 22; 253 (1336):69-75.
55. Fernández Nieves GA, Barrantes FJ, Antollini SS. Modulation of nicotinic acetylcholine receptor conformational state by free fatty acids and steroids. *J Biol Chem.* 2008 Aug 1;283(31):21478-86.

56. Franke C, Parnas H, Hovav G, Dudel J. A molecular scheme for the reaction between acetylcholine and nicotinic channels. *Biophys J*. 1993 Feb; 64(2):339-56.
57. Fucile S, Palma E, Martinez-Torres A, Miledi R, Eusebi F. The single-channel properties of human acetylcholine alpha 7 receptors are altered by fusing alpha 7 to the green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19; 99(6):3956-61.
58. Galzi JL, Bertrand D, Devillers-Thiéry A, Revah F, Bertrand S, Changeux JP. Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the alpha 7 neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*. 1991 Dec 9; 294(3):198-202.
59. Galzi JL, Revah F, Black D, Goeldner M, Hirth C, Changeux JP. Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites. *J Biol Chem*. 1990 Jun 25; 265(18):10430-7.
60. Gelman MS, Chang W, Thomas DY, Bergeron JJ, Prives JM. Role of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin in subunit folding and assembly of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*. 1995 Jun 23; 270(25):15085-92
61. Giraudat J, Montecucco C, Bisson R, Changeux JP. Transmembrane topology of acetylcholine receptor subunits probed with photoreactive phospholipids. *Biochemistry*. 1985 Jun 18; 24(13):3121-7.
62. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*. 2004 Dec; 74(6):363-96.
63. Green ME. Computer simulations and modeling of ion channels. *Methods Enzymol*. 1998; 293:694-723.
64. Green WN, Wanamaker CP. The role of the cystine loop in acetylcholine receptor assembly. *J Biol Chem*. 1997 Aug 15; 272(33):20945-53
65. Grosman C, Auerbach A. Asymmetric and independent contribution of the second transmembrane segment 12' residues to diliganded gating of acetylcholine receptor channels: a single-channel study with choline as the agonist. *J Gen Physiol*. 2000 May; 115(5):637-51.
66. Gu Y, Ralston E, Murphy-Erdosh C, Black RA, Hall ZW. Acetylcholine receptor in a C2 muscle cell variant is retained in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 1989 Aug; 109(2):729-38.
67. Gutiérrez-Merino C, Bonini de Romanelli IC, Pietrasanta LI, Barrantes FJ. Preferential distribution of the fluorescent phospholipid probes NBD-phosphatidylcholine and rhodamine-

- phosphatidylethanolamine in the exofacial leaflet of acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry*. 1995 Apr 11;34(14):4846-55.
68. Hamill OP, Sakmann B. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature*. 1981 Dec 3; 294(5840):462-4.
 69. Hanley MR, Eterovic VA., Hawkes SP, Herbert AJ, Bennett EL. (1977) Neurotoxins of *Bungarus multicinctus* venom.. Purification and partial characterization. *Biochemistry* 16, 5840-5849.
 70. Hartig PR, Raftery MA. Preparation of right-side-out, acetylcholine receptor enriched intact vesicles from *Torpedo californica* electroplaque membranes. *Biochemistry*. 1979 Apr 3;18(7):1146-1150.
 71. Heidmann T, Changeux JP. Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. *Eur J Biochem*. 1979 Feb 15;94(1):281-96
 72. Huang LY, Catterall WA, Ehrenstein G. Selectivity of cations and nonelectrolytes for acetylcholine-activated channels in cultured muscle cells. *J Gen Physiol*. 1978 Apr; 71(4):397-410.
 73. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*. 1962 May 5; 194:495-6.
 74. Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des*. 2006; 12(28):3573-8.
 75. Jackson MB. Spontaneous openings of the acetylcholine receptor channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jun; 81(12):3901-4.
 76. Jones S, Sudweeks S, Yakel JL. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci*. 1999 Dec; 22(12):555-61
 77. Kao PN, Karlin A. Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem*. 1986 Jun 25; 261(18):8085-8.
 78. Karlin A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Feb; 3(2):102-14.
 79. Katz B, Thesleff F. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol*. 1957 Aug 29; 138(1):63-80.
 80. Kim YJ, Ko HH, Han ES, Lee CS. Lamotrigine inhibition of rotenone- or 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced mitochondrial damage and cell death. *Brain Res Bull*. 2007 Mar 30;71(6):633-40

81. Kurzen H, Henrich C, Booken D, Poenitz N, Gratchev A, Klemke CD, Engstner M, Goerd S, Maas-Szabowski N. Functional characterization of the epidermal cholinergic system in vitro. *J Invest Dermatol.* 2006 Nov;126(11):2458-72.
82. Lang DG, Wang CM, Cooper BR. Lamotrigine, phenytoin and carbamazepine interactions on the sodium current present in N4TG1 mouse neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Aug; 266(2):829-35.
83. Langosch D, Thomas L, Betz H.. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Oct; 85(19):7394-8.
84. Le Novère and Changeux. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol.* 1995 Feb; 40(2):155-72.
85. Leach MJ, Marden CM, Miller AA. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: II. Neurochemical studies on the mechanism of action. *Epilepsia.* 1986 Sep-Oct; 27(5):490-7.
86. Lindstrom JM. Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Sep; 998:41-52.
87. Liu Y, Dilger JP. Decamethonium is a partial agonist at the nicotinic acetylcholine receptor. *Synapse.* 1993 Jan; 13(1):57-62.
88. Löschmann PA, Eblen F, Wüllner U, Wachtel H, Kockgether T. Lamotrigine has no antiparkinsonian activity in rat models of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol.* 1995 Sep 15;284(1-2):129-34
89. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov; 193(1):265-75.
90. Lurtz MM, Pedersen SE, Aminotriarylmethane dyes are high-affinity noncompetitive antagonists of the nicotinic acetylcholine receptor, *Mol. Pharmacol.* 55 (1999) 159–167.
91. Macdonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia.* 1995; 36 Suppl 2:S2-12.
92. Malany S, Osaka H, Sine SM, Taylor P. Orientation of alpha-neurotoxin at the subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry.* 2000 Dec 19; 39(50):15388-98.
93. Marshall CG, Ogden D, Colquhoun D. Activation of ion channels in the frog endplate by several analogues of acetylcholine. *J Physiol.* 1991 Feb; 433:73-93

94. Martin M, Czajkowski C, Karlin A. The contributions of aspartyl residues in the acetylcholine receptor gamma and delta subunits to the binding of agonists and competitive antagonists. *J Biol Chem.* 1996 Jun 7; 271(23):13497-503.
95. Mashru R, Sutariya V, Sankalia M, Sankalia J, Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccalmucosa: in vitro determination of routes of buccal transport, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 28 (2005) 54–62.
96. Meldrum B S. Update on the mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 1996; 37 Suppl 6:S4-11.
97. Mishina M, Tobimatsu T, Imoto K, Tanaka K, Fujita Y, Fukuda K, Kurasaki M, Takahashi H, Morimoto Y, Hirose T. Location of functional regions of acetylcholine receptor alpha-subunit by site-directed mutagenesis. *Nature.* 1985 Jan 31-Feb 6; 313(6001):364-9.
98. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature.* 2003 Jun 26; 423(6943):949-55
99. Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol.* 1965 May; 12:88-118.
100. Montal M, Opella SJ. The structure of the M2 channel-lining segment from the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Oct 11; 1565(2):287-93. Review.
101. Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA.. Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem.* 1994 Feb; 62(2):815-8.
102. Neher E, Steinbach JH. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol.* 1978 Apr; 277:153-76.
103. Nishizaki T, Matsuoka T, Nomura T, Kondoh T, Watabe S, Shiotani T, Yoshii M. Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors as a functional target of nefiracetam in inducing a long-lasting facilitation of hippocampal neurotransmission. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2000; 14 Suppl 1:S82-94.
104. Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Hirose T, Asai M, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S.. Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature.* 1983 Jan 20; 301(5897):251-5.
105. Ohno K, Wang HL, Milone M, Bren N, Brengman JM, Nakano S, Quiram P, Pruitt JN, Sine SM, Engel AG. Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron.* 1996 Jul; 17(1):157-70.

106. O'Leary ME, White MM. Mutational analysis of ligand-induced activation of the Torpedo acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 1992 Apr 25; 267(12):8360-5.
107. Pedersen SE, Cohen JB. d-Tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Apr;87(7):2785-9
108. Peng JH, Lucero L, Fryer J, Herl J, Leonard SS, Lukas RJ. Inducible, heterologous expression of human alpha7-nicotinic acetylcholine receptors in a native nicotinic receptor-null human clonal line. *Brain Res.* 1999 Apr 17; 825(1-2):172-9.
109. Peng X, Katz M, Gerzanich V, Anand R, Lindstrom J. Human alpha 7 acetylcholine receptor: cloning of the alpha 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional alpha 7 homomers expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol.* 1994 Mar; 45(3):546-54.
110. Pereira EF, Reinhardt-Maelicke S, Schratzenholz A, Maelicke A, Albuquerque EX. Identification and functional characterization of a new agonist site on nicotinic acetylcholine receptors of cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Jun;265(3):1474-91.
111. Plazas PV, Katz E, Gomez-Casati ME, Bouzat C, Elgoyhen AB. Stoichiometry of the alpha9alpha10 nicotinic cholinergic receptor. *J Neurosci.* 2005 Nov 23; 25(47):10905-10912.
112. Prince RJ, Sine SM. Epibatidine binds with unique site and state selectivity to muscle nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 1998 Apr 3;273(14):7843-9.
113. Prince RJ, Pennington RA, Sine SM, Mechanism of tacrine block at adult human muscle nicotinic acetylcholine receptors, *J. Gen. Physiol.* 120 2002 369–393.
114. Puchacz E, Buisson B, Bertrand D, Lukas RJ. Functional expression of nicotinic acetylcholine receptors containing rat alpha 7 subunits in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 1994 Nov 7; 354(2):155-9.
115. Quick MW, Lester RA. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol.* 2002 Dec; 53(4):457-78.
116. Raftery MA, Hunkapiller MW, Strader CD, Hood LE.. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science.* 1980 Jun 27; 208(4451):1454-6.
117. Ragsdale DS, Avoli M. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 Mar;26(1):16-28.
118. Roccamo AM, Pediconi MF, Aztiria E, Zanella L, Wolstenholme A, Barrantes FJ. Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Neurosci.* 1999 May; 11(5):1615-23.

119. Roccamo AM, Barrantes FJ. Charged amino acid motifs flanking each extreme of the alphaM4 transmembrane domain are involved in assembly and cell-surface targeting of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurosci Res.* 2007 Feb 1;85 (2):285-93.
120. Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jul;5(7):553-64.
121. Role LW, Berg DK. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron.* 1996 Jun; 16(6):1077-85.
122. Ross AF, Green WN, Hartman DS, Claudio T. Efficiency of acetylcholine receptor subunit assembly and its regulation by cAMP. *J Cell Biol.* 1991 May;113(3):623-36
123. Ross E. Farmacodinámica: Mecanismos de acción de los fármacos y relación entre su concentración y efecto, en *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (Goodman Gilman A, Rall T, Nies A y Taylor P) Ed. Panamericana (1993):49-63.
124. Ruff RL. A quantitative analysis of local anaesthetic alteration of miniature end-plate currents and end-plate current fluctuations. *J Physiol.* 1977 Jan; 264(1):89-124.
125. Sakmann B, Patlak J, Neher E. Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature.* 1980 Jul 3; 286(5768):71-3.
126. Salamone FN, Zhou M, Auerbach A. A re-examination of adult mouse nicotinic acetylcholine receptor channel activation kinetics. *J Physiol.* 1999 Apr 15; 516 (Pt 2):315-30.
127. Samochocki M, Höffle A, Fehrenbacher A, Jostock R, Ludwig J, Christner C, Radina M, Zerlin M, Ullmer C, Pereira EF, Lübbert H, Albuquerque EX, Maelicke A. Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jun; 305(3):1024-36.
128. Schroeder KM, Wu J, Zhao L, Lukas RJ. Regulation by cycloheximide and lowered temperature of cell-surface alpha7-nicotinic acetylcholine receptor expression on transfected SH-EP1 cells. *J Neurochem.* 2003 May; 85(3):581-91.
129. Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci.* 1993 Feb; 13(2):596-604.
130. Shaw KP, Aracava Y, Akaike A, Daly JW, Rickett DL, Albuquerque EX. The reversible cholinesterase inhibitor physostigmine has channel-blocking and agonist effects on the acetylcholine receptor-ion channel complex. *Mol. Pharmacol.* 28 (1985) 527-538.
131. Sine SM, Steinbach JH. Agonists block currents through acetylcholine receptor channels. *Biophys J.* 1984 Aug; 46(2):277-83.

132. Sine S, Taylor P. Functional consequences of agonist-mediated state transitions in the cholinergic receptor. *Studies in cultured muscle cells, J. Biol. Chem.* 254 (1979) 3315–3325.
133. Sine SM, Claudio T, Sigworth FJ. Activation of Torpedo acetylcholine receptors expressed in mouse fibroblasts. Single channel current kinetics reveal distinct agonist binding affinities. *J Gen Physiol.* 1990 Aug; 96(2):395-437.
134. Sine SM, Kreienkamp HJ, Bren N, Maeda R, Taylor P. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of alpha-conotoxin M1 selectivity. *Neuron.* 1995 Jul; 15(1):205-11.
135. Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, Pruitt JN, Engel AG. Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron.* 1995 Jul; 15(1):229-39.
136. Sine SM, Quiram P, Papanikolaou F, Kreienkamp HJ, Taylor P. Conserved tyrosines in the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor stabilize quaternary ammonium groups of agonists and curariform antagonists. *J Biol Chem.* 1994 Mar 25; 269(12):8808-16.
137. Sine SM. Identification of equivalent residues in the gamma, delta, and epsilon subunits of the nicotinic receptor that contribute to alpha-bungarotoxin binding. *J Biol Chem.* 1997 Sep 19; 272(38):23521-7.
138. Sine SM. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 15; 90(20):9436-40.
139. Smith MM, Lindstrom J, Merlie JP. Formation of the alpha-bungarotoxin binding site and assembly of the nicotinic acetylcholine receptor subunits occur in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1987 Mar 25;262(9):4367-76.
140. Southam E, Pereira R, Stratton SC, Sargent R, Ford AJ, Butterfield LJ, Wheable JD, Beckett SR, Roe C, Marsden CA, Hagan RM. Effect of lamotrigine on the activities of monoamine oxidases A and B in vitro and on monoamine disposition in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2005 Sep 20;519(3):237-45.
141. Stefan H, Feuerstein TJ. Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacol Ther.* 2007 Jan; 113(1):165-83.
142. Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Differential inhibition by riluzole, lamotrigine, and phenytoin of sodium and calcium currents in cortical neurons: implications for neuroprotective strategies. *Exp Neurol.* 1997 Sep;147(1):115-22.
143. Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Gabapentin inhibits calcium currents in isolated rat brain neurons. *Neuropharmacology.* 1998a;37(1):83-9.

144. Stefani A, Hensworth A, Spadoni F., Bernardi G. The lamotrigine analogue 619 C 89 has been shown to inhibit sodium channels and cloned N typed calcium channels. *Br J Pharmacol.* 1998b; 125(5): 1058–1064.
145. Storch A, Schratzenholz A, Cooper JC, Abdel Ghani EM, Gutbrod O, Weber KH, Reinhardt S, Lobron C, Hermsen B, Soskiç V, et al. Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur J Pharmacol.* 1995 Aug 15;290(3):207-19
146. Tomaselli GF, McLaughlin JT, Jurman ME, Hawrot E, Yellen G. Mutations affecting agonist sensitivity of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J.* 1991 Sep; 60(3):721-7.
147. Unwin N .Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol.* 1993 Feb 20; 229(4):1101-24.
148. Unwin N. Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell.* 1993 Jan; 72 Suppl:31-41.
149. Unwin N. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* 2003 Nov 27; 555(1):91-95.
150. Upton N. Mechanisms of action of new antiepileptic drugs: rational design and serendipitous findings. *Trends Pharmacol Sci.* 1994 Dec;15(12):456-63.
151. van den Beukel I, van Kleef RG, Zwart R, Oortgiesen M, Physostigmine and acetylcholine differentially activate nicotinic receptor subpopulations in *Locusta migratoria* neurons, *Brain Res.* 789 1998 263–273.
152. Vallés AS, Garbus I, Barrantes FJ. Lamotrigine is an open-channel blocker of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroreport.* 2007 Jan 8; 18(1):45-50.
153. Vallés AS, Garbus I, Antollini SS, Barrantes FJ. A novel agonist effect on the nicotinic acetylcholine receptor exerted by the anticonvulsive drug Lamotrigine. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Oct; 1778(10):2395-404.
154. Walker JW, Lukas RJ, McNamee MG. Effects of thio-group modifications on the ion permeability control and ligand binding properties of *Torpedo californica* acetylcholine receptor. *Biochemistry.* 1981 Apr 14; 20(8):2191-9.
155. Wanamaker CP, Christianson JC, Green WN. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Sep;998:66-80.
156. Wang SJ, Huang CC, Hsu KS, Tsai JJ, Gean PW. Presynaptic inhibition of excitatory neurotransmission by lamotrigine in the rat amygdalar neurons. *Synapse.* 1996 Nov; 24(3):248-55.

-
157. Wang JM, Zhang L, Yao Y, Viroonchatapan N, Rothe E, Wang ZZ. A transmembrane motif governs the surface trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Neurosci.* 2002 Oct;5(10):963-70.
 158. White HS. Comparative anticonvulsant and mechanistic profile of established and newer antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 1999;40 Suppl 5:S2-10.
 159. Williams ME, Burton B, Urrutia A, Shcherbatko A, Chavez-Noriega LE, Cohen CJ, Aiyar J. Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells. *Biol Chem.* 2005 Jan 14; 280(2):1257-63. Epub 2004 Oct 25.
 160. Xu Y, Barrantes FJ, Shen J, Luo X, Zhu W, Chen K, Jiang H. Blocking of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel by chlorpromazine, a noncompetitive inhibitor: A molecular dynamics simulation study. *J Phys Chem B.* 2006 Oct 19;110(41):20640-8.
 161. Yakel JL, Shao XM, Jackson MB. The selectivity of the channel coupled to the 5-HT3 receptor. *Brain Res.* 1990 Nov 12; 533(1):46-52.
 162. Zhao L, Kuo YP, George AA, Peng JH, Purandare MS, Schroeder KM, Lukas RJ, Wu J. Functional properties of homomeric, human alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in the SH-EP1 human epithelial cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jun; 305(3):1132-41.
 163. Zona C, Avoli M. Lamotrigine reduces voltage-gated sodium currents in rat central neurons in culture. *Epilepsia.* 1997 May; 38(5):522-5.

Publicaciones

1. Vallés, Ana S.; Garbus, Ingrid; Barrantes, Francisco J. Lamotrigine is an open-channel blocker of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuroreport*. 18(1):45-50, January 8, 2007.
2. Ginny G. Farías, Ana S. Vallés, Marcela Colombres, Ronald J. Lukas, Francisco J. Barrantes and Nivaldo C. Inestrosa. Wnt-7a Induces Presynaptic Colocalization of $\alpha 7$ -Nicotinic Acetylcholine Receptors and Adenomatous Polyposis Coli in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 16; 27(20):5313-5325, May 2007.
3. Cláudia Funchal, Gisela Aguire, Ana Sofía Vallés and Dan McIntyre. Past, present and future of epilepsy (Passado, presente e futuro da epilepsia). *Ciência em Movimento*. Ano IX (18) 2007/2.
4. Ana Sofía Vallés, Ingrid Garbus, Silvia S. Antollini and Francisco J. Barrantes. The anticonvulsive drug Lamotrigine activates the nicotinic acetylcholine receptor through an agonist-independent site of action. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct; 1778(10):2395-404.
5. Vallés AS, Roccamo AM, Barrantes FJ. Expression of $\alpha 7$ AChR at cell surface of $\alpha 7$ -AChR-Ric-3 cells. En preparación.