

Tesis de Posgrado

El receptor nicotínico de *Discopyae Tschudii* : caracterización bioquímica y estudios funcionales en membranas reconstituídas

Medrano, Silvia

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Medrano, Silvia. (1988). El receptor nicotínico de *Discopyae Tschudii* : caracterización bioquímica y estudios funcionales en membranas reconstituídas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2099_Medrano.pdf

Cita tipo Chicago:

Medrano, Silvia. "El receptor nicotínico de *Discopyae Tschudii* : caracterización bioquímica y estudios funcionales en membranas reconstituídas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2099_Medrano.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Receptor Nicotinic

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

EL RECEPTOR NICOTINICO DE Discopyge tschudii: CARACTERIZACION
BIOQUIMICA Y ESTUDIOS FUNCIONALES EN MEMBRANAS RECONSTITUIDAS

Autor: Licenciada Silvia Medrano

Director: Doctor Enrique L.M. Ochoa

Lugar de trabajo: Instituto de Biología Celular, Facultad de
Medicina, Universidad de Buenos Aires

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

-1988-

2099
Ej. 2.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique L.M. Ochoa, bajo cuya dirección me inicié en la investigación científica, por su constante apoyo y estímulo que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Pecci Saavedra, por brindarme la posibilidad de trabajar en el Instituto de Biología Celular que él dirige.

A los Profesores Eméritos Dra Amanda Pellegrino de Iraldi y Dr. Eduardo De Robertis, por su permanente estímulo y por su ejemplo de dedicación a la investigación.

A la Profesora Dra. Carmen De La Serna de Esteban, por su acertado asesoramiento como consejera de estudios.

A la Profesora María Berta Cousseau, por hacer posible el envío de los animales utilizados en este trabajo y por su constante apoyo e interés en el mismo.

A los Dres. Mirtha Biscoglio de Jimenez Bonino y Osvaldo Cascone por su colaboración en los estudios de electroforesis en geles y análisis de aminoácidos.

A los Dres. Orlando Aguilar Márquez y Emilio Rivas, con quienes compartí parte de este trabajo, por sus sugerencias y oportunas críticas.

A los Dres. Héctor Carminati y Víctor Idoyaga Vargas, por su permanente ayuda y estímulo.

El presente trabajo de tesis fue desarrollado durante el transcurso de las Becas de Iniciación, Perfeccionamiento y Formación Superior que me fueron concedidas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y mediante subsidios otorgados por dicha institución.

ABREVIATURAS

ACE	acetilcolinesterasa
ATC	acetiltiocolina
BAC	bromoacetilcolina
BSA	albúmina de suero bovino
Carb	carbamilcolina
Dns-C ₆ -Cho	β-(metabromuro)etilester del ácido 6-5-(dimetil-amino)-1-naftalensulfo-namido hexanoico
d-TC	d-tubocurarina
DTT	ditiotreitól
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
L/P	relación lípido-proteína
PMSF	fluoruro de fenilmetil-sulfonilo
QM	quinacrina mostaza
SDS	dodecil sulfato de sodio
TPo	timopoyetina
TP5	timopentina
Tris	Tris (hidroximetil)-amino metano
α-BuTx	alfa-bungarotoxina
α-CTX	alfa-cobrotoxina

INDICE

I. INTRODUCCION	1
I.1 INTRODUCCION GENERAL	1
a. La transmisi ^o n sinàptica	1
b. Desarrollo històrico de la teoria de los receptores .	2
c. Receptores colinèrgicos	4
d. La transmisi ^o n neuromuscular	6
I.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL RECEPTOR NICOTINICO PE- RIFERICO	7
a. Toxinas curaremi ^m èticas	7
b. El òrgano elèctrico de peces	10
c. Aislamiento y purificaci ^o n del receptor	13
I.3 CARACTERIZACION MOLECULAR DEL RECEPTOR AISLADO DEL OR- GANO ELECTRICO DE TORPEDO	14
a. Dimensiones y forma.....	14
b. Composici ^o n en subunidades	14
c. Propiedades quìmicas	17
I.4 ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE TORPEDO EN LA MEMBRANA	17
a. Membranas ricas en receptor nicotìnico	17
b. Disposici ^o n del receptor en la membrana	18
c. Modelos de la organizaci ^o n del receptor en la membra- na	20
I.5 ACTIVACION E INACTIVACION DEL RECEPTOR NICOTINICO	22
a. El concepto de desensibilizaci ^o n	22
b. Activaci ^o n e inactivaci ^o n (desensibilizaci ^o n) del re- ceptor nicotìnico	23
c. Cambios conformacionales inducidos por la uni ^o n de ligandos al receptor	25

d.	Modelos funcionales del receptor nicotínico	27
e.	Mecanismos de activación e inactivación del receptor nicotínico deducidos por estudios de cinética rápida.	28
f.	Factores que modifican la desensibilización del re- ceptor nicotínico	32
g.	Efecto de las hormonas del timo sobre la transmisión neuromuscular	33
I.6	LIGANDOS NICOTINICOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS	36
a.	Agonistas y antagonistas competitivos	36
b.	Bloqueantes no competitivos	38
i.	Probables mecanismos de acción de los bloqueantes no competitivos	40
ii.	Sitios de unión de los bloqueantes no competitivos.	41
c.	La amantadina	46
I.7	RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO	49
a.	El concepto de reconstitución	49
b.	Reconstitución del receptor nicotínico en liposomas .	50
II.	OBJETIVOS	54
III.	MATERIALES Y METODOS	55
III.1	ANIMALES DE EXPERIMENTACION	55
III.2	PREPARACION DE MEMBRANAS CONTENIENDO RECEPTOR NICOTI- NICO DE ORGANO ELECTRICO	56
a.	Preparación de fracciones crudas de membranas	56
b.	Preparación de fracciones de membranas más purifica- das	56
III.3	EXTRACCION Y PURIFICACION DEL RECEPTOR	58
a.	Solubilización del receptor	58

b. Síntesis de bromoacetilcolina	58
c. Preparación de la columna de afinidad	59
d. Purificación del receptor por cromatografía de afinidad	59
III.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	60
III.5 ANALISIS DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS SUBUNIDADES	61
III.6 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR EN LIPOSOMAS POR EL METODO DE DIALISIS DE COLATO	61
a. Reconstitución a partir de membranas	61
b. Reconstitución a partir de receptor purificado	62
III.7 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR EN LIPOSOMAS POR EL METODO DE PRECIPITACION CON PEG	62
a. Procedimiento de reconstitución	62
b. Purificación de las muestras de PEG	63
III.8 PRUEBAS DE INCORPORACION DEL RECEPTOR A LIPOSOMAS ...	63
III.9 ANALISIS DE LA FUNCION DEL RECEPTOR	64
a. Fijación de [125 I]- α -bungarotoxina	64
i. Titulación de la solución de [125 I]- α -bungarotoxina.	64
ii. Fijación de [125 I]- α -bungarotoxina en equilibrio...	64
b. Evaluación de los estados de afinidad del receptor ..	65
i. Evaluación cualitativa de los estados de afinidad ..	65
ii. Evaluación cuantitativa de los estados de afinidad.	71
iii. Curso temporal de las transiciones de afinidad ...	73
c. Medición del influjo iónico mediado por el receptor nicotínico	74
i. Preparación de las columnas de intercambio catiónico	74
ii. Medición del influjo de 86 Rb $^{+}$	75
iii. Determinación del volumen interno de las vesículas	76

iv. Curso temporal del proceso de inactivación (desensibilización de la respuesta del receptor	76
III.10 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA	77
III.11 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS	78
III.12 DROGAS UTILIZADAS	78
IV. RESULTADOS	80
IV.1 CARACTERIZACION DEL RECEPTOR NICOTINICO DEL ORGANITO ELECTRICO DE <u>Discopyge tschudii</u>	80
a. Estudios del receptor nicotínico en membranas nativas	80
b. Extracción y purificación del receptor nicotínico por cromatografía de afinidad	81
IV.2 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO EN LIPOSOMAS ..	83
a. Influxo de $^{86}\text{Rb}^+$ y fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-bungarotoxina}$ al receptor nicotínico incorporado a liposomas	83
b. Detección de los estados de afinidad para Carb del receptor nicotínico reconstituido en liposomas	84
c. Inactivación de la respuesta del receptor reconstituido en liposomas en presencia de agonistas (desensibilización)	86
IV.3 EFECTO DE LA AMANTADINA SOBRE EL RECEPTOR NICOTINICO EN MEMBRANAS RECONSTITUIDAS	88
IV.4 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO POR EL METODO DE PRECIPITACION CON POLIETILENGLICOL	92
IV.5 ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DE LA TIMOPENTINA (TP5) SOBRE EL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIPOSOMAS	99
V. DISCUSION	128

V.1 CARACTERIZACION DEL RECEPTOR NICOTINICO DEL ORGANNO E- LECTRICO DE <u>D. tschudii</u>	128
V.2 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO EN LIPOSOMAS ...	133
V.3 EFECTO DE LA AMANTADINA SOBRE EL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIPOSOMAS	137
V.4 INCORPORACION DEL RECEPTOR NICOTINICO EN LIPOSOMAS POR EL METODO DE PRECIPITACION CON PEG	143
V.5 EFECTO DE LA TIMOPENTINA SOBRE LA FUNCION DEL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIPOSOMAS	149
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES	153
VII. REFERENCIAS	157

INTRODUCCION

I.1. INTRODUCCION GENERAL

I.1.a La transmisión sináptica

La comunicación entre dos células nerviosas o neuronas o entre una neurona y una célula efectora se realiza a través de zonas especializadas de contacto denominadas sinapsis (del griego: unión), término introducido por Sherrington en el año 1897.

A comienzos del siglo XX se creía que la transmisión nerviosa operaba por un mecanismo único. Los fisiólogos pensaban que la transmisión sináptica era eléctrica, o sea a través del pasaje directo del flujo de corriente de una célula a otra. Los farmacólogos, por otro lado, pensaban que la transmisión sináptica se realizaba a través de un mediador químico liberado por las terminaciones nerviosas. Posteriormente se comprobó la existencia de ambos mecanismos.

Las primeras evidencias que apoyaron la hipótesis química fueron aportadas por Elliot en el año 1904 (referencia en Klein y col., 1982), quien observó un estrecho paralelismo entre la acción de la adrenalina y la estimulación de los nervios simpáticos. Más tarde se comprobó que el mediador químico a ese nivel es la noradrenalina (von Euler, 1946).

Otto Loewi en 1921 (ref. en Kuffler y Nicholls, 1982 a) demostró que si estimulaba el nervio vago de la rana se producía la disminución de la frecuencia cardíaca y que si se transfería el líquido de perfusión de dicho órgano a un segundo corazón, la

frecuencia cardíaca de este último también disminuía. Loewi sugirió que la estimulación del nervio vago producía la liberación de una sustancia inhibidora a la que denominó "Vagusstoff".

Posteriormente, Dale y col. (1936) demostraron que la estimulación del músculo esquelético de mamíferos provocaba la liberación de acetilcolina, quedando demostrada en forma definitiva la existencia de sinapsis químicas en el sistema nervioso.

I.1.b Desarrollo histórico de la teoría de los receptores

El desarrollo del concepto de receptores específicos está ligado a los primeros estudios sobre el receptor a la acetilcolina.

El fisiólogo Claude Bernard en 1857 (ref. en Changeux, 1981) demostró la acción periférica del curare en el músculo esquelético de la rana.

Emil Fisher en 1894 y 1898 (ref. en Changeux, 1981), en sus estudios sobre la transformación de azúcares por las levaduras, propuso la existencia de "agentes químicos activos" en las células y postuló que para que los mismos pudieran actuar sobre las azúcares era necesario que tuvieran una construcción geométrica análoga que les permitiera adaptarse el uno al otro como "una llave en una cerradura".

El concepto de receptor fue introducido por John N. Langley. En sus estudios sobre la acción antagónica de la atropina sobre la pilocarpina en la glándula submaxilar del gato, Langley en 1878 (ref. en Parascandola, 1981), postuló que en las terminaciones nerviosas o en las células glandulares, existía una o más sustancias con las cuales las drogas estudiadas deberían

formar compuestos para ejercer su acción.

Posteriormente, y continuando con los estudios de Bernard en la unión mioneural, Langley demostró la acción antagónica del curare y de la nicotina en el músculo esquelético del pollo y en los músculos sartorio y gastrocnemio de la rana (Langley 1905, 1906, 1907, ref. en Changeux, 1981 y Parascandola, 1981). Langley observó que la contracción muscular producida por la nicotina se debía a un efecto directo de esta droga sobre la fibra muscular, ya que cuando seccionaba el nervio motor del músculo, la nicotina era capaz de seguir induciendo una contracción. Además, observó que el curare, el cual se creía que actuaba sobre las terminaciones nerviosas, antagonizaba la acción de la nicotina aún cuando se quitaba la inervación del músculo.

Esto llevó a Langley a pensar que tanto la nicotina como el curare actuaban directamente sobre la fibra muscular y postuló que dicho antagonismo se debía a que ambas drogas se combinaban con la misma sustancia protoplasmática. Al observar que el curare no era capaz de inhibir la contracción del músculo cuando éste era estimulado eléctricamente, concluyó que la sustancia que se contraía era diferente de la sustancia con la cual la nicotina y el curare se combinaban y denominó a esta última "receptive substance".

En forma independiente, Ehrlich en 1897 (ref. en Parascandola, 1981) sugirió también que algunas sustancias debían unirse a otras para ejercer su acción, y postuló la llamada "teoría de la cadena lateral" para explicar la neutralización de las toxinas bacterianas por el organismo. Según esta teoría, el protoplasma celular estaba constituido por una gran molécula compuesta por un núcleo que era responsable de las funciones

especificas de cada tipo celular y varias cadenas laterales ligadas a procesos vitales comunes a todas las células.

Sin embargo en ese tiempo Ehrlich se rehusó a aplicar el concepto de receptores para explicar la acción de las drogas sobre el organismo. Posteriormente reconoció que ciertas drogas se unirían a las células a través de grupos atómicos de las mismas a los que llamó "quimiorreceptores" estableciendo las bases de la quimioterapia.

La idea de la existencia de receptores de Langley y Ehrlich fue elaborada en forma cuantitativa por Hill en 1909 tomando como base la ley de acción de masas y posteriormente Clark en 1933 reunió todas las evidencias sobre la interacción entre drogas y receptores en la llamada "teoría de los receptores".

I.1.c Receptores colinérgicos

Los efectos de la acetilcolina en el sistema nervioso periférico de los vertebrados han sido divididos en nicotínicos y muscarínicos según criterios farmacológicos (Dale, 1914).

El neurotransmisor que se libera en las terminaciones nerviosas parasimpáticas postganglionares que inervan las glándulas exócrinas, el músculo liso y el cardíaco es la acetilcolina. La acción de la acetilcolina en estos tejidos es imitada por un alcaloide vegetal extraído del hongo Amanita muscaria, la muscarina, y bloqueada por la atropina, denominándose por lo tanto acción muscarínica (Litter, 1975 a).

En las terminaciones nerviosas preganglionares simpáticas y parasimpáticas, y en la unión neuromuscular se libera también acetilcolina, pero en este caso su acción es imitada por otro alcaloide vegetal, la nicotina, extraído de Nicotiana

tabacum. El hexametonio y el curare bloquean los efectos de este alcaloide a nivel de los ganglios y la unión neuromuscular respectivamente (Litter, 1975 a). Esta acción de la acetilcolina se denomina nicotínica.

Por extensión, a los receptores involucrados en una y otra respuesta se los denomina receptores muscarínicos y receptores nicotínicos.

Las diferentes acciones de la acetilcolina se deben probablemente a distintas características estructurales de los receptores involucrados y no del neurotransmisor. Se ha demostrado que la conformación de la molécula de acetilcolina es similar en cada caso. La comparación de la estructura de la molécula de acetilcolina con la estructura de agonistas nicotínicos y muscarínicos de alta potencia ha permitido demostrar que distintos grupos de la molécula de acetilcolina interactúan con uno y otro receptor (Chothia, 1970).

Se han encontrado receptores muscarínicos y nicotínicos en otras regiones del sistema nervioso. Las sinapsis colinérgicas se pueden clasificar, entonces, de acuerdo a su localización:

- 1) Sinapsis colinérgicas periféricas : a) la unión neuromuscular (nicotínica); b) terminaciones postganglionares parasimpáticas en músculo liso y cardíaco y glándulas exócrinas (muscarínicas); c) terminaciones postganglionares especiales (nicotínicas).
- 2) Sinapsis colinérgicas centrales: a) cerebro (muscarínicas y probablemente nicotínicas); b) terminaciones preganglionares autónomas (nicotínicas); c) unión de las células de Renshaw de la médula espinal con la motoneurona del asta anterior (nicotínica).

Como se explicará más adelante, el receptor nicotínico media efectos rápidos, medidos en un intervalo de tiempo del orden

de los milisegundos (mseg) y opera a través de un canal por donde pasan los iones Na^+ y K^+ .

El receptor muscarínico media respuestas más lentas, en el rango de segundos a minutos. Se ha postulado la existencia de por lo menos dos tipos de receptores muscarínicos denominados M_1 y M_2 . Los receptores M_1 y M_2 se diferencian en cuanto a sus respuestas fisiológicas. La activación de los receptores M_2 produce la inhibición de la enzima adenilato ciclasa a través de una proteína que fija nucleótidos de guanina. Por otro lado los receptores M_1 están relacionados con la hidrólisis de fosfoinosítidos, la liberación de calcio del retículo endoplasmático y la estimulación de proteinaquinasas (Harden y col., 1986).

I.1.d La transmisión neuromuscular

La transmisión de señales de una neurona motora a una fibra muscular esquelética constituye un ejemplo típico de neurotransmisión química. En la sinapsis neuromuscular de mamífero la motoneurona ubicada en el asta anterior de la médula espinal, envía un axón mielínico que al llegar a las cercanías de una fibra muscular esquelética pierde su vaina de mielina y emite una serie de ramificaciones. La sinapsis entre una motoneurona y una fibra muscular se denomina unión neuromuscular (rev. en Kuffler y Nicholls, 1982 b).

El potencial de acción es conducido desde el cuerpo de la neurona a lo largo del axón. La despolarización en el terminal nervioso produce un aumento de la conductancia del Ca^{2+} lo que determina un aumento de la concentración intracelular de dicho catión y la liberación del neurotransmisor. El transmisor químico

que se libera en la unión neuromuscular es la acetilcolina (Dale y col., 1936). En el terminal nervioso la acetilcolina se encuentra almacenada en vesículas de 50 nm de diámetro, cada una de las cuales contiene 10^4 moléculas del neurotransmisor (Kuffler y Yoshikami, 1975). La liberación de acetilcolina es de naturaleza cuántica y cada "cuanto" o "paquete" corresponde a la cantidad de neurotransmisor contenido en una vesícula sináptica (del Castillo y Katz, 1954).

La acetilcolina liberada difunde a través de un espacio de 60 nm y se fija al receptor nicotínico ubicado en la membrana postsináptica (Fertuck y Salpeter, 1974). La fijación de la acetilcolina al receptor nicotínico produce la apertura de canales específicos por donde los iones Na^+ y K^+ atraviesan la membrana a favor de sus gradientes electroquímicos. Este flujo de iones produce un cambio local del potencial de membrana, se dispara un potencial de acción y se activa el mecanismo de contracción muscular (Gage, 1976).

La transmisión neuromuscular es terminada por hidrólisis de la acetilcolina a acetato y colina por la acetilcolinesterasa (ACE), enzima localizada en la superficie de la membrana postsináptica (para una revisión completa sobre la ACE ver Rosenberry, 1975).

I.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL RECEPTOR NICOTINICO PERIFERICO

I.2.a Toxinas curaremiméticas

Las toxinas presentes en el veneno de ciertas serpientes constituyen herramientas poderosas para el estudio de algunos mecanismos biológicos.

Un grupo muy importante de estos compuestos lo

constituyen las toxinas postsinápticas o curaremiméticas.

Se ha observado que las toxinas curaremiméticas bloquean en forma casi irreversible la acción de la acetilcolina sobre la unión neuromuscular, uniéndose en forma específica al receptor nicotínico ya que no afectan los potenciales de reposo y de acción del nervio, la liberación de acetilcolina ni la actividad de la enzima ACE y su efecto es bloqueado por el curare (ref. en Potter, 1974; Lee, 1979).

Las toxinas curaremiméticas se han encontrado únicamente en dos familias: Elapidae e Hydrophiidae (Lee, 1979) y se clasifican en dos grupos:

a) De cadena corta: contienen 60 a 62 aminoácidos y 4 puentes disulfuro. Géneros Laticauda, Enhydrina, Felamis, Hydrophis, Aipysurus, Naja, Dendroaspis.

b) De cadena larga: contienen 71 a 74 aminoácidos y 5 puentes disulfuro. Géneros Bungarus, Ophiophagus, Naja, Dendroaspis, Laticauda.

Chicheportiche y col. (1975) estudiaron las propiedades de fijación de toxinas curaremiméticas de cadena larga (neurotoxina III de Naja haje) y de cadena corta (toxina I de N. haje y toxina I de N. mossambica) marcadas con ^{14}C a membranas de órgano eléctrico de Torpedo marmorata. Estos autores demostraron que ambos tipos de toxinas curaremiméticas tienen constantes de disociación similares ($5.7-8.2 \times 10^{-10}\text{M}$, pH 7.4, 20°C) pero difieren en sus propiedades de asociación y disociación al y del receptor respectivamente. Las toxinas de cadena corta se asocian 6 a 7 veces y se disocian 5 a 9 veces más rápidamente que las de cadena larga. La distinta cinética de disociación podría explicar la mayor irreversibilidad del bloqueo de la toxinas de cadena

larga (Chicheportiche y col., 1975).

Dentro de las toxinas de cadena larga, la α -bungarotoxina (α -BuTx) es la que se une en forma menos reversible y es por lo tanto la más utilizada en el estudio del receptor nicotínico (Lee, 1979).

La α -BuTx se obtiene del veneno de Bungarus multicinctus. Esta serpiente es característica de Formosa (China), habita en lugares húmedos y no es agresiva para el hombre (Potter, 1974).

Mediante técnicas de cromatografía de exclusión molecular y de intercambio catiónico se han obtenido doce proteínas puras del veneno de B. multicinctus (Miledi y col., 1971). Cuatro de dichas proteínas bloquean la acción de la acetilcolina en el músculo sartorio de la rana, seis bloquean la liberación de acetilcolina de los nervios motores, una corresponde a la ACE y la última no tiene acción sobre la unión neuromuscular. Entre las primeras, la más abundante es la α -BuTx, la cual representa el 25% de la proteína total del veneno.

El análisis de aminoácidos de la α -BuTx purificada reveló que la molécula está compuesta por 74 aminoácidos y posee un peso molecular de 7.983 (Lee y col., 1972).

Se ha demostrado que la α -BuTx y demás toxinas curaremiméticas bloquean la función del receptor nicotínico en varios otros tejidos, entre ellos el órgano eléctrico de Torpedo sp. (Miledi y col., 1971) y de Electrophorus sp. (Changeux y col., 1970).

Las toxinas curaremiméticas han sido marcadas con isótopos radiactivos, siendo el ^{125}I el más utilizado.

Se ha demostrado que la marcación con ^{125}I produce

derivados monoiodados y diiodados (Vogel y col., 1972). El derivado monoiodado posee propiedades cinéticas idénticas que la toxina nativa en su interacción con el receptor de T. californica (Blanchard y col., 1979).

Los estudios de difracción de rayos X han permitido establecer la estructura terciaria de estas proteínas. Low, 1979 (ref. en Changeux, 1981) ha sugerido que el grupo guanidinio del residuo de arginina 37 sería análogo al amonio cuaternario de la acetilcolina y el responsable de la unión específica de estos compuestos al receptor nicotínico.

I.2.b El órgano eléctrico de peces

Los peces eléctricos eran conocidos ya por los antiguos Egipcios, Griegos y Romanos por su capacidad de producir descargas eléctricas.

En el año 1877, Du Bois-Reymond señaló la importancia de estos animales en cuanto a que su estudio contribuiría a solucionar los grandes problemas de la fisiología del nervio y del músculo.

Los peces eléctricos pertenecen a grupos muy alejados filogenéticamente. Comprenden peces cartilaginosos tales como la rayas eléctricas (géneros Torpedo, Narcine, Dyscophye) y peces óseos como la anguila eléctrica (Electrophorus electricus) y los pertenecientes a los géneros Malapterurus, Astroscopus, Gymnarchus, Mormyrus y Gymnotus (Grundfest, 1960).

La forma, número y disposición de los órganos eléctricos varía en los distintos grupos (Grundfest, 1960).

En las especies que producen grandes descargas, los órganos eléctricos sirven para defenderse de sus depredadores y

paralizar a sus presas, mientras que en las especies que producen descargas más débiles sirven para guiarse en la navegación y para la detección de depredadores y presas (Grundfest, 1960).

El órgano eléctrico está formado por columnas de células aplanadas, multinucleadas, denominadas electroplacas o electrocitos. Estas células derivan embriológicamente de electroblastos, células semejantes a los mioblastos precursores de las células musculares (Bishop y col., 1950).

Las rayas eléctricas poseen dos órganos eléctricos ubicados a ambos lados del cuerpo. Cada órgano posee aproximadamente 2.000 columnas dispuestas en sentido dorsoventral y compuestas por unas 1.000 células. En la anguila eléctrica cada órgano eléctrico posee aproximadamente 70 columnas de 6.000 a 10.000 electroplacas ubicadas en sentido longitudinal (Grundfest, 1960).

Sólo una superficie de la electroplaca está inervada (la caudal en E. electricus y la ventral en las especies de Torpedo) recibiendo una densa red de terminaciones nerviosas (Grundfest, 1960).

Las electroplacas operan en serie dentro de cada columna y las distintas columnas lo hacen en paralelo (Changeux, 1981). En la anguila, el gran número de electroplacas en serie le permite generar grandes voltajes (hasta 250 voltios) y las columnas en paralelo corrientes de 0.5 amperios. Las rayas, por otro lado, generan potenciales menores (20-60 voltios) debido a la menor resistencia del agua de mar, pero debido al gran número de columnas en paralelo las descargas eléctricas son muy altas (50 amperios).

Cada órgano eléctrico está bajo control nervioso. Las

fibras nerviosas que lo inervan provienen de un núcleo par (los lóbulos eléctricos) ubicado en el tronco encefálico (Bennet, 1970).

Las sinapsis del órgano eléctrico son químicamente similares a las establecidas entre el nervio y el músculo esquelético. Feldberg y Fessard en 1942 (ref. en Bishop y col., 1950), demostraron que la acetilcolina es el neurotransmisor que se libera en las sinapsis del órgano eléctrico.

El órgano eléctrico es el tejido más rico en acetilcolina y contiene 40-100 µg/g tejido fresco (Bishop y col., 1950) y contiene aproximadamente 250 veces más ACE que el músculo esquelético (Nachmansohn, 1959).

El órgano eléctrico de Torpedo sp. contiene aproximadamente 1 nmol receptor nicotínico/ gramo de tejido, mientras que en el músculo hay 1 pmol receptor nicotínico/ gramo de tejido (ref. en Lindstrom, 1979). Las características bioquímicas, farmacológicas y funcionales del receptor nicotínico del órgano eléctrico son similares a las del receptor del músculo (Karlin, 1980; Conti-Tronconi y Raftery, 1982; Barrantes, 1983).

Los miembros del orden Torpediniformes se caracterizan por poseer cuerpo de forma circular, piel lisa, cola corta y bien desarrollada y un par de órganos eléctricos ubicados entre las aletas pectorales y el cuerpo. El género Discopyge, perteneciente a la familia Narcinidae, se caracteriza por presentar boca angosta y protráctil y poseer dientes pequeños y curvados ubicados en bandas sujetas débilmente al cartilago de las quijadas. Los márgenes posteriores de las aletas ventrales están unidos a través de la base de la cola por una conexión membranosa (Menni y col., 1984).

La especie Discopyge tschudii fue descrita por primera vez por Heckel en el año 1846 (Norman, 1937). Se distribuye a lo largo de las costas de la República Argentina, Chile y Perú. En la República Argentina se han encontrado especímenes entre 34°36' y 46°18' de latitud sur y a una profundidad máxima de 107 metros (Norman 1937).

A nivel ultraestructural existe una gran similitud en la morfología del órgano eléctrico de D. tschudii y el de las especies de la familia Torpedinidae (Iraldi y col. 1984; Mendez y col. 1984) .

El órgano eléctrico de D. tschudii se ha utilizado para estudios de la reconstitución de la enzima ACE en liposomas (Ochoa, 1978; 1980 a) y para el análisis de sus formas moleculares (Ochoa 1980 b; Mendez y col. 1984).

1.2.c Aislamiento y purificación del receptor

El receptor nicotínico del órgano eléctrico de E. electricus, Torpedo sp., Narcine sp. y del músculo esquelético de la rata y el gato ha sido extraído de preparaciones crudas de membranas mediante detergentes no iónicos o sales biliares. El receptor extraído fue purificado por cromatografía de afinidad usando toxinas curaremiméticas, agonistas o antagonistas nicotínicos unidos covalentemente a agarosa (ver Tabla 2 en Karlin 1980).

La máxima actividad específica, determinada por la fijación de toxinas curaremiméticas marcadas, del material purificado oscila entre 6 y 12 μ moles de toxina/g de proteína. Las diferencias entre los distintos laboratorios se deben al procedimiento de purificación y al tipo de toxina y ensayo de

fijación utilizados (Karlin, 1980).

I.3 CARACTERIZACION MOLECULAR DEL RECEPTOR AISLADO DEL ORGANNO ELECTRICO DE TORPEDO

I.3.a Dimensiones y forma

El receptor de Torpedo sp., presenta propiedades hidrodinámicas heterogéneas.

Reynolds y Karlin (1978), demostraron mediante técnicas de equilibrio y de velocidad de sedimentación que el receptor nicotínico purificado del órgano eléctrico de T. californica existe en dos formas moleculares cuyos coeficientes de sedimentación son 8.6 S y 12.8 S y sus radios de Stokes de 7.3 nm y 9.5 nm respectivamente. El peso molecular de estas formas es 250.000 y 500.000. Ambas especies poseen una actividad específica de 8 nmoles de toxina/mg de proteína y su composición en aminoácidos es similar (McNamee y col. 1975) por lo que se las considera monómero y dímero respectivamente (Reynolds y Karlin, 1978).

Hamilton y col. (1977) han demostrado que el tratamiento con agentes reductores de puentes disulfuro convierte la forma pesada en una forma que sedimenta junto a la forma liviana en gradientes de sacarosa. Los autores concluyeron que el dímero está formado por la unión de dos monómeros a través de dichos enlaces.

I.3.b Composición en subunidades

Se ha demostrado por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) que el receptor purificado de T. californica está formado por 4 tipos de subunidades de peso molecular 39.000, 48.000, 58.000 y 64.000

(Weill y col., 1974). Estos resultados fueron confirmados por otros autores para diferentes especies de los géneros Torpedo y Narcine (ver Tabla 2 en Karlin, 1980) y se denominaron α , β , γ y δ en orden creciente de peso molecular.

La estequiometría de las subunidades es $2\alpha:\beta:\gamma:\delta$, y fue deducida teniendo en cuenta un peso molecular del monómero de 250.000, una fijación específica de toxina de 8 nmoles/mg proteína para el receptor purificado y los peso molecular de cada una de las subunidades (Reynolds y Karlin, 1978).

La organización pentamérica heteróloga de la molécula del receptor fue confirmada por determinaciones cuantitativas de geles (Lindstrom y col., 1979) y por secuenciación parcial de las subunidades (Raftery y col., 1980).

El análisis de la composición de aminoácidos de las subunidades de T. californica aisladas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS reveló que existen grandes similitudes entre las mismas y que todas poseen un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Vandlen y col., 1979; Lindstrom y col., 1979).

Los estudios de secuenciación parcial de las subunidades aisladas permitieron observar que existen secuencias homólogas entre las mismas (Raftery y col., 1980).

La homología entre las subunidades ha sido confirmada por Tzartos y Lindstrom (1980) mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor nicotínico purificado de T. californica y contra cada subunidad aislada.

Las técnicas de genética molecular permitieron conocer la secuencia completa de las 4 subunidades. A partir de RNAm aislado del órgano eléctrico se obtuvo el DNA complementario que

codifica para cada subunidad y a partir de la secuencia nucleotídica de este último se ha podido deducir la secuencia aminoacídica completa de los precursores de cada subunidad del receptor del género Torpedo. En el caso de la subunidad α (Noda y col., 1982) el precursor posee 461 aminoácidos incluyendo un prepeptido altamente hidrofóbico de 24 residuos que correspondería al péptido señal. Los precursores de las subunidades β y δ (Noda y col., 1983 a) y τ (Noda y col., 1983 b; Claudio y col., 1983) poseen 493, 522 y 506 aminoácidos y comprenden una secuencia señal de 24, 21 y 17 residuos respectivamente.

El peso molecular de las subunidades calculado a partir de la secuencia primaria de las mismas es 50.116 (α), 53.681 (β), 56.279 (τ) y 57.565 (δ).

La comparación de la estructura primaria completa de las 4 subunidades confirmó la existencia de una marcada homología entre ellas (Noda y col., 1983 b).

La alta homología existente entre las subunidades sugiere que las mismas habrían surgido a partir de un gen ancestral común (Raftery y col., 1980). La mayor homología entre las subunidades α y β por un lado y entre las subunidades τ y δ por el otro sugiere que durante la evolución se produjo probablemente la duplicación de un gen que dio origen a dos protogenes, cada uno de los cuales se duplicó y dio origen a los linajes $\alpha - \beta$, y $\tau - \delta$ (Noda y col., 1983 b).

En la actualidad se conocen las secuencias completas de las cadenas del receptor nicotínico del músculo de varias especies de mamíferos incluyendo el hombre (ref. en Stroud y Finer-Moore, 1985).

La estructura molecular del receptor nicotínico se ha

conservado a través del Phylum Vertebrata, ya que el 55-81% de los residuos en las secuencias conocidas son idénticos a los residuos de las cadenas correspondientes en las especies de Torpedo (Stroud y Finer-Moore, 1985).

I.3.c Propiedades químicas

Se ha demostrado la presencia de hidratos de carbono en las 4 subunidades del receptor por tinción con ácido periódico-base de Schiff de geles de acrilamida (Vandlen y col., 1979).

Mediante técnicas cuantitativas se ha determinado que los hidratos de carbono que componen el receptor nicotínico son manosa, galactosa, glucosa, glucosamina y ácido siálico y representan el 4-7% del peso total del receptor (Lindstrom y col., 1979).

El receptor purificado de T. californica contiene 10 átomos de fósforo por monómero incluyendo fosfoserina (Reynolds y Karlin, 1978).

I.4 ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE TORPEDO EN LA MEMBRANA

I.4.a Membranas ricas en receptor nicotínico

Para poder comprender el mecanismo por el cual el receptor nicotínico regula el transporte de iones a través de la membrana, es necesario comprender cómo la molécula se encuentra integrada en la misma.

Sobel y col. (1977) han desarrollado un método de purificación de membranas de órgano eléctrico de T. marmorata en las cuales se ha logrado una concentración de receptor nicotínico

de 4 nmoles toxina/ mg proteina. En las preparaciones más purificadas de membranas el receptor representa 40-50 % de la masa de proteina total.

Reed y col. (1975) observaron que los fragmentos de membranas ricos en receptor nicotínico de T. californica analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS poseen los mismos componentes polipeptídicos que el receptor purificado.

En preparaciones de membranas purificadas de T. marmorata analizadas por la misma técnica se observó una banda predominante entre las subunidades α y β . Un componente de dicha banda se denomina "proteina de 43.000" (Sobel y col., 1978) o "proteina γ " (Hamilton y col., 1979).

La proteina de 43 Kdaltons puede ser extraida en forma selectiva de las preparaciones de membranas ricas en receptor nicotínico de Torpedo sp. cuando las mismas son tratadas con una solución alcalina (pH 11) por 1 hora a 23°C. Las propiedades funcionales del receptor no se alteran en ausencia de dicho componente (Neubig y col., 1979).

Se ha observado que la proteina de 43 Kdaltons se ubica en el lado citoplasmático de la membrana y su función está relacionada con el anclaje del receptor a la misma (para una revisión sobre el tema ver Karlin, 1980).

I.4.b Disposición del receptor en la membrana

En esta sección y la siguiente se mencionarán los aspectos más importantes sobre la disposición del receptor en la membrana y los modelos postulados. Excelentes revisiones sobre el tema se pueden encontrar en Karlin (1980), Finer-Moore y Stroud

(1985). y Karlin (1983).

Las membranas ricas en receptor nicotínico del género Torpedo presentan por tinción negativa y congelación-grabado al microscopio electrónico partículas de 8-9 nm de diámetro con una región central oscura de 2 nm. La densidad de dichas partículas es de 10.000/ μm^2 . Mediante el empleo de anticuerpos contra receptor purificado de T. californica acoplados a oro coloidal o a ferritina, se ha demostrado que tales partículas corresponden al receptor. Cada partícula es la imagen de un monómero de receptor y el dímero aparece como dos partículas contiguas. Por análisis de imágenes computarizado se ha demostrado que existen cinco picos de distinta densidad electrónica distribuidos alrededor del poro central y que corresponderían a las cinco subunidades que componen el receptor nicotínico.

En el plano perpendicular a la membrana el receptor de T. californica se extiende 5 nm hacia el espacio extracelular y 1,5 - 2 nm hacia el lado citoplasmático de la membrana, con una longitud total de 11 nm, lo que fue demostrado mediante el empleo de anticuerpos contra el receptor purificado acoplados a ferritina, por difracción de rayos X de vesículas y por tinción negativa de membranas tratadas con anticuerpos acoplados con oro coloidal o ferritina.

Cada subunidad es accesible al ataque proteolítico por tripsina, a la fijación de anticuerpos y a la iodinación radioisotópica a ambos lados de la membrana, lo que sugiere que las cinco subunidades atraviesan la misma.

Se ha observado por tinción negativa de membranas que un canal atraviesa las mismas y que tiene un diámetro de 0.7 nm.

Las subunidades α no se disponen en forma contigua

alrededor del canal, y no se conoce con certeza si es la subunidad β o la γ la que se ubica entre ambas subunidades α .

I.4.c Modelos de la organización del receptor en la membrana

A partir de las secuencias completas de las subunidades que componen el receptor (Noda y col., 1982; 1983 a; b; Claudio y col., 1983; Devillers-Thiéry y col., 1983) se pueden reconocer en cada subunidad las siguientes regiones:

- a) Una secuencia señal altamente hidrofóbica formada por 17-24 aminoácidos y que está ausente en la proteína madura.
- b) Un dominio hidrofílico de 210-224 aminoácidos.
- c) Una región hidrofóbica de 68 aminoácidos, que se puede dividir en tres regiones M_1 , M_2 y M_3 de 19-27 residuos no cargados delimitadas por residuos polares y que podrían formar α -hélices.
- d) Un dominio hidrofílico de 109-146 aminoácidos.
- e) Una cuarta región hidrofóbica (M_4) de 29-46 residuos, de estructura α -hélice.

Los autores coinciden en que el extremo amino terminal de las subunidades se dispone hacia el lado extracelular de la membrana. Esto fue observado por Wennogle y Changeux (1980) quienes demostraron que el extremo amino terminal y los residuos de hidratos de carbono se preservan luego del tratamiento proteolítico selectivo de las subunidades desde el lado citoplasmático de la membrana.

Lo que aún queda por establecer es el número y orientación de los segmentos que atraviesan la membrana. En dos trabajos de revisión (Changeux y col., 1984; Guy y Hucho, 1987) se discuten los modelos propuestos hasta el momento sobre la disposición del receptor en la membrana.

Un primer modelo propone que la molécula atraviesa la bicapa lipídica 4 veces a nivel de las 4 regiones hidrofóbicas de la molécula de receptor nicotínico. Como consecuencia de esta disposición el extremo carboxilo terminal se orienta hacia el lado extracelular de la membrana. Numa y colaboradores, proponen que serían los segmentos M₁ y M₂ los que forman el canal por ser los más conservados en las 4 subunidades. Más recientemente, Changeux y colaboradores, han propuesto que es el segmento M₂ el que forma el canal. Esto se debe a la observación que los bloqueantes no competitivos, que se piensa se fijan al canal del receptor nicotínico, marcan aminoácidos específicos dentro de dicho segmento y a experimentos de mutagénesis dirigida que revelan la importancia de la región M₂ en las propiedades de conductancia de la membrana de Xenopus sp.

El segundo modelo propuesto por Finer-Moore y Stroud y por Guy, postula la existencia de una quinta α -hélice anfipática (M₅) formada a expensas del dominio citoplasmático. Esta hélice anfipática, con una faz hidrofóbica continua hacia un lado y una hidrofílica hacia el otro constituiría una interfase entre el canal y los dominios hidrofóbicos de la membrana. Este canal cargado, con 21 cargas (-) y 19 cargas (+), sería entonces selectivo para los cationes. Con la incorporación de un quinto segmento que atraviesa la membrana, el extremo carboxilo terminal queda expuesto hacia el lado citoplasmático de la membrana.

Lindstrom y colaboradores han propuesto un tercer modelo a partir de sus estudios utilizando anticuerpos monoclonales. Según este modelo, la α -hélice anfipática y el segmento M₄ estarían ubicados fuera de la membrana en el dominio citoplasmático de la molécula; se postula, además, la existencia

de dos segmentos adicionales denominados M₆, de estructura de hoja plegada, y M₇, de naturaleza anfipática y de estructura α -hélice, que formaría el canal.

I.5 ACTIVACION E INACTIVACION DEL RECEPTOR NICOTINICO

I.5.a El concepto de desensibilización

La desensibilización es un término que describe la pérdida de la sensibilidad celular como consecuencia de la presencia prolongada de un activador. El fenómeno de desensibilización se ha observado en una amplia variedad de sistemas celulares, desde las bacterias hasta los mamíferos, lo que sugiere que constituye un componente regulatorio importante de la capacidad homeostática de los procesos de reconocimiento celular (Triggle, 1981).

Se puede distinguir una desensibilización aguda, que se desarrolla en forma rápida, es generalmente reversible y resulta en la pérdida de la función del receptor (inactivación funcional) y una desensibilización crónica que es lenta y está acompañada de una reducción en el número de receptores (regulación en menos o "down regulation").

El fenómeno de desensibilización ha sido observado en varios sistemas: los receptores adrenérgicos de tipo α y β , los receptores a opiáceos, el receptor a la IgE en los mastocitos, el receptor a la insulina y el receptor al factor de crecimiento epidérmico. En todos estos casos la señal para la desensibilización es la fosforilación de la molécula del receptor.

Otros dos sistemas están relacionados con la regulación y adaptación de los receptores (Levitzki, 1986). Ambos involucran modificaciones covalentes de los receptores implicados. Uno de

ellos lo constituyen las bacterias que tienen la capacidad de adaptarse a los cambios en la composición química del medio. El mecanismo de adaptación involucra la metilación del receptor, y el mayor o menor grado de metilación está dado por un balance en las actividades de metilasas y esterasas. El segundo es el sistema visual de los mamíferos en el cual la luz activa la rodopsina y por lo tanto es análogo a un sistema ligando-receptor. La rodopsina activada a su vez activa la transducina. La desensibilización de la señal visual, que permite la adaptación a distintas intensidades de luz, se debería a la fosforilación de la rodopsina que ya no sería capaz de interactuar con la transducina.

La desensibilización de la respuesta del receptor nicotínico fue descrita por Katz y Thesleff (1957) e involucra un cambio conformacional de la molécula y no una modificación covalente de la misma. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la fosforilación del receptor nicotínico acelera la velocidad de desensibilización (Huganir y col., 1986).

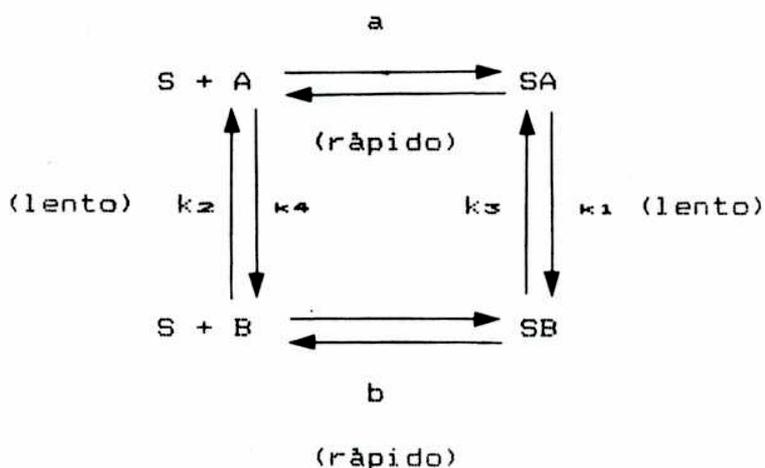
I.5.b Activación e inactivación (desensibilización) del receptor nicotínico

Durante la transmisión nerviosa a nivel de la unión neuromuscular y en la electroplaca se produce una rápida liberación de acetilcolina, su concentración local se eleva a 10^{-3}M - 10^{-4}M por sobre el nivel basal de 10^{-9}M (Kuffler y Yoshikami, 1975).

Como se mencionó anteriormente, el receptor nicotínico opera a través de un canal que se abre al unirse la acetilcolina, y por el cual los iones Na^+ y K^+ atraviesan la membrana a favor de sus gradientes electroquímicos.

La curva de la respuesta del receptor en función de la concentración de acetilcolina es sigmoidea (Katz y Thesleff, 1957 y referencias en Changeux, 1981), siendo el coeficiente de Hill (nH) de 1,8, lo que sugiere que al menos dos moléculas del agonista contribuyen a la apertura del canal. No está establecido aún si la forma de la curva dosis-respuesta se debe a fenómenos cooperativos en la fijación de acetilcolina. Se ha observado cooperatividad positiva en la fijación de acetilcolina al receptor nicotínico en ciertas condiciones experimentales (Weber y Changeux, 1974 b; Cohen y col., 1974; Covarrubias y col., 1986).

Katz y Thesleff (1957) observaron que cuando la acetilcolina era aplicada durante varios minutos sobre las placas terminales del músculo sartorio de la rana se producía una disminución de la amplitud de la respuesta de la fibra muscular a la acetilcolina. Los autores postularon que durante la exposición prolongada del músculo a la acetilcolina, la membrana postsináptica se convertía en una forma no reactiva hacia el agonista es decir se "desensibilizaba" y sugirieron un modelo cíclico para explicar este fenómeno.



De acuerdo a esta hipótesis el receptor puede existir en

dos estados: uno activo (A) y uno inactivo (B), y solo A es capaz de producir la despolarización de la membrana muscular al unirse al ligando (S). Las condiciones que deben cumplirse son a) la constante de afinidad de B (b) sea \gg que la constante de afinidad de A (a); b) la constante de velocidad de la transición de SA a SB (k_1) debe ser $>$ que la constante del proceso opuesto (k_2) y c) $a/b > k_1/k_2$

Este modelo explica la relación entre la velocidad de desensibilización y de reactivación, y la dependencia de la velocidad de desensibilización con la concentración de acetilcolina aplicada observadas experimentalmente.

El fenómeno de la desensibilización se ha observado luego del tratamiento prolongado a agonistas del receptor nicotínico del órgano eléctrico en membranas nativas (Sugiyama y col., 1976; Walker y col., 1981 b; Neubig y col., 1982) y en membranas reconstituidas (Walker y col., 1982). Esto último sugiere que se trata de una propiedad intrínseca del receptor.

En las especies del género Torpedo la desensibilización ocurre en dos etapas: una rápida (en el rango de mseg) y una lenta (en el orden de seg) (Walker y col., 1981 b; 1982).

I.5.c Cambios conformacionales inducidos por la unión de ligandos al receptor

Cuando se intentó estudiar la correlación entre la fijación de agonistas con la apertura del canal iónico se observó que la constante de disociación en equilibrio de la acetilcolina era 4 a 5 órdenes de magnitud inferior que la constante de disociación aparente para la respuesta (Weber y Changeux, 1974 b). Este problema fue resuelto a través de los estudios del cambio de

las propiedades de fijación de ligandos al receptor nicotínico en función del tiempo de exposición a los agonistas.

La exposición de fragmentos de membranas de T. marmorata a agonistas pero no a antagonistas produce una disminución de la velocidad inicial de fijación de [3 H]- α -toxina y este cambio corresponde a un aumento de afinidad del receptor nicotínico para Carb. El desarrollo temporal del cambio de afinidad es similar al curso temporal de la disminución de la amplitud de la respuesta luego de la preincubación con el agonista. Se propuso, entonces, que el receptor nicotínico se encuentra en la membrana en reposo en un estado de baja afinidad por los agonistas, y que la estabilización del estado de alta afinidad se correlaciona con la desensibilización farmacológica (Weber y col., 1975).

El incremento en la afinidad del receptor nicotínico para agonistas luego de una exposición prolongada a los mismos fue comprobado directamente mediante la utilización de un marcador de espín (Weiland y col., 1976). La correlación entre el cambio de afinidad en presencia de agonistas y la desensibilización fisiológica fue corroborada ampliamente (Weiland y col., 1977; Quast y col., 1978; Weiland y Taylor, 1979).

Mediante el empleo de un agonista nicotínico fluorescente: el β -(metabromuro) etil éster del ácido 6-5-(dimetilamino)-1-naftalen sulfonamido hexanoico (Dns-C₆-Cho) y técnicas de cinética rápida para medir su fijación a fragmentos de membranas ricos en receptor nicotínico de T. marmorata, Heidmann y Changeux (1979) han detectado los distintos estados conformacionales del receptor nicotínico. Un aumento rápido en la intensidad de fluorescencia (en el rango de tiempo de msec) se correlacionó con la unión del agonista a una población de sitios

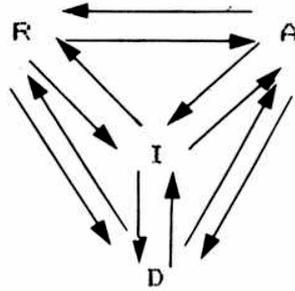
de alta afinidad ($K_D = 3 \text{ nM}$), que existen previamente en la membrana y que representan el 20 % de las moléculas de receptor; un proceso intermedio (en el rango de msec a seg) corresponde a la unión del agonista a sitios de baja afinidad y un proceso lento (seg) corresponde a la transición de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad. Posteriormente, Heidmann y col. (1983 a) mediante estudios de fijación de Dns-C α -Cho y de cambios en la permeabilidad iónica producidos por el mismo agonista pudieron correlacionar los tres estados conformacionales del receptor por ellos detectados: el estado de baja afinidad (50 μM), el estado transitorio de afinidad intermedia (1 μM) y el estado de alta afinidad (3 nM), con un incremento de la permeabilidad (activación) y con las etapas rápida y lenta del proceso de desensibilización respectivamente.

I.5.d Modelos funcionales del receptor nicotínico

El modelo más aceptado y que es compatible con los estudios electrofisiológicos y bioquímicos realizados hasta el momento, es el modelo alostérico. Este modelo es una adaptación del modelo concertado para las transiciones alostéricas de las enzimas propuesto por Monod y col. (1965) y el modelo de Katz y Thesleff (1957) para la desensibilización del receptor nicotínico del músculo esquelético. Según el modelo alostérico (Neubig y Cohen, 1980; Heidmann y Changeux, 1980) el receptor nicotínico puede encontrarse en cuatro estados: estado de reposo (R), estado activo (A), un estado al cual se llega luego de la etapa rápida de desensibilización (I) y estado desensibilizado (D). Los estados R y D coexisten en la membrana. El estado R es favorecido en ausencia del agonista y el estado D en su presencia. La afinidad

del receptor nicotínico para la acetilcolina aumenta de R a D a través de A e I, siendo las constantes de disociación 50 a 100 μM para el estado R, menor que 1 μM para el estado I y 3 a 5 nM para el estado D. Los estados son discretos e interconvertibles.

El modelo se puede esquematizar de la siguiente forma:



Se han propuesto otros modelos conformacionales del receptor nicotínico (referencias en Covarrubias y col., 1986). Uno de ellos es el modelo ocupacional (Maelicke y Prinz, 1983). Según este modelo, el cual de basa únicamente en datos de fijación de agonistas y antagonistas al receptor nicotínico, los distintos conformeros del receptor no preexisten en la membrana. Los mismos son inducidos por la unión del ligando al receptor. De esta manera el modelo ocupacional se refiere a "estados específicos del receptor ocupado por el ligando" en contraposición a "los estados existentes en ausencia del ligando" propuestos por el modelo alostérico.

1.5.e Mecanismos de activación e inactivación del receptor nicotínico deducidos por estudios de cinética rápida

El pasaje de iones a través de la membrana mediado por el receptor nicotínico produce una señal eléctrica cuya amplitud está determinada por la velocidad relativa a la cual los iones

pasan. Esta velocidad depende del número de canales abiertos y de la concentración del agonista.

Hess y colaboradores han desarrollado un método para medir la velocidad del flujo iónico en un rango de tiempo relevante desde el punto de vista fisiológico. Esta técnica fue desarrollada en primer término en vesículas de E. electricus (Hess y col., 1979) y se denomina de flujo interrumpido ("quenched flow").

Los estudios se basaron en cuatro tipos de determinaciones: 1) velocidad de flujo del estado activo del receptor 2) velocidad de flujo correspondiente al equilibrio entre las formas de reposo y desensibilizada del receptor; 3) velocidad de inactivación (desensibilización) de la respuesta; 4) velocidad del proceso de recuperación del estado inactivo. En base a estas determinaciones, realizadas sobre un amplio rango de concentraciones de los agonistas Carb y acetilcolina, se postuló un mecanismo mínimo y una ecuación integrada de velocidad de flujo basada en dicho mecanismo que relaciona la fijación de ligandos con el fenómeno de translocación iónica (Cash y Hess, 1980; Hess y col., 1980; Aoshima y col., 1980; 1981).

Los parámetros obtenidos a partir de los estudios de cinética rápida, tales como el número de iones que pasan por canal y por unidad de tiempo (10^7 iones por molécula de receptor nicotínico y por segundo) y la constante específica de velocidad de flujo iónico ($3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$) son comparables con los resultados obtenidos por mediciones de conductancia de canales únicos en células musculares (Hess y col., 1981).

La misma metodología se aplicó a las vesículas preparadas a partir del órgano eléctrico de I. californica,

$$M = M_0 \left[1 - \exp \left[-J_A(t) \left(\frac{1 - e^{-\alpha t}}{\alpha} + J_I \left(\frac{1 - e^{-\beta t}}{\beta} \right) \right) \right] \right]$$

donde M y M₀ son las concentraciones del ión adentro y afuera de la vesículas.

α es el coeficiente de velocidad de la inactivación rápida.

β es el coeficiente de velocidad de la inactivación lenta.

$$J_A(t) = J^* [R^* L_2]_{\text{abierto}}$$

$$J_I = J^* [R^* L_2]_{\text{PE}}$$

De esta forma se han podido estimar los valores de la constante de velocidad de flujo inicial J_{A max} (310 seg⁻¹), los coeficientes de velocidad de la etapa rápida α_{max} (2 seg⁻¹) y de la etapa lenta β (0,12 seg⁻¹) de la desensibilización y la constante de velocidad del flujo lento luego de la inactivación rápida J_{I max} (1,3 seg⁻¹).

Recientemente, Hess y colaboradores (revisión en Udgaonkar y Hess, 1987) han demostrado mediante experimentos de cinética rápida, la existencia de un sitio de unión de acetilcolina distinto del sitio que conduce a la apertura del canal y a la inactivación (desensibilización) del receptor nicotínico.

La fijación de la acetilcolina a dicho sitio, denominado sitio isostérico, depende del potencial de membrana y previene la formación de canales. Mediante la regulación isostérica se disminuye el número de moléculas de receptor nicotínico capaces de formar canales durante la transmisión nerviosa a un valor crítico, cercano al valor mínimo requerido para producir la respuesta. De

esta forma la respuesta de la célula postsináptica se hace particularmente dependiente de la concentración de acetilcolina liberada. La regulación isostérica se produce en una escala de tiempo comparable con la apertura del canal (1 msec) y así la desensibilización, cuya primera etapa transcurre en un rango de tiempo de 100 a 300 msec, cumpliría una función regulatoria impidiendo la transmisión de una nueva señal, cuando el número de receptores activables es el mínimo requerido para la respuesta.

I.5.f Factores que modifican la desensibilización del receptor nicotínico

Se ha descrito la existencia de sustancias capaces de modificar la velocidad a la cual se produce la desensibilización del receptor nicotínico.

Mediante experimentos electrofisiológicos se ha demostrado en preparaciones neuromusculares de la rana que el Ca^{2+} acelera la velocidad de desensibilización en presencia del agonista Carb, y se postuló que el dicho catión actuaría directamente sobre la molécula del receptor nicotínico promoviendo el estado inactivo (Manthey, 1966). Se ha sugerido, también, que el Ca^{2+} se uniría a los grupos fosfato de los fosfolípidos de la membranas formando complejos que afectarían el funcionamiento normal de los canales (Magazanick y Vyskocil, 1970).

El efecto del Ca^{2+} sobre la velocidad de desensibilización fue observado en fragmentos de membranas ricos en receptor nicotínico de T. marmorata siguiendo la velocidad de inactivación del flujo de $^{22}\text{Na}^+$ (Sugiyama y col., 1976).

Otro factor que acelera la desensibilización del receptor nicotínico es la fosforilación; y se ha determinado que

los sitios que se fosforilan por una proteinaquinasa dependiente de AMP_c, son la serina 354 de la subunidad α y la serina 361 de la subunidad β , ambas localizadas en el pequeño dominio hidrofílico de la molécula de receptor nicotínico orientado hacia el citoplasma (Huganir y col., 1986).

Más recientemente se ha observado que una hormona del timo, la timopoyetina, bloquea la transmisión neuromuscular aparentemente promoviendo la desensibilización del receptor nicotínico (Revah y col., 1987).

I.5.g Efecto de las hormonas del timo sobre la transmisión neuromuscular

Las timopoyetinas I y II (originalmente denominadas timinas I y II) son dos polipéptidos estructuralmente relacionados que pueden ser aislados del timo bovino (Goldstein, 1974). Debido a que estos polipéptidos fueron aislados a partir de la reunión de timos de diferentes animales y a que son indistinguibles desde el punto de vista funcional, se los considera el producto de un único gen polimórfico (Audhya y col., 1981) y se los denomina genéricamente timopoyetina (Tpo).

Mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo policlonal dirigido contra un péptido sintético que contiene el sitio activo de la Tpo, se demostró que la hormona se localiza en las células epitelio reticulares del timo (Viamontes y col., 1986).

La Tpo tiene varios efectos en el sistema inmunológico. Se demostró que la hormona induce la diferenciación de protimocitos de la médula ósea y del bazo del ratón a células con las características antigénicas y funcionales de los timocitos

tanto "in vitro" (Basch y Goldstein, 1974; 1975; Komuro y col., 1975) como "in vivo" (Scheid y col., 1975). Estos cambios involucran la adquisición de antígenos de diferenciación TL y Thy-1 (θ) y la capacidad de responder al mitógeno concanavalina A (Basch y Goldstein, 1975). Por el contrario la Tpo inhibe la maduración de los linfocitos B, lo que queda evidenciado por la incapacidad de las células tratadas "in vitro" con la hormona de expresar el antígeno FC, el cual constituye el segundo paso en la diferenciación de las células B (Scheid y col., 1978). Además la Tpo modula los linfocitos maduros incrementando los niveles de GMP_c y disminuyendo los de AMP_c , y aumenta la respuesta proliferativa de las células T periféricas a la estimulación alogeneica (Sunshine y col., 1978).

Además de las acciones inmunológicas, la Tpo tiene efecto sobre la transmisión neuromuscular. La idea de la existencia de una sustancia liberada del timo que bloquea la transmisión neuromuscular surgió del estudio de la enfermedad neuromuscular conocida como Miastenia Gravis. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición de signos de debilidad y fatigabilidad muscular causada por un defecto en la transmisión neuromuscular y está asociada generalmente a patologías en el timo.

Se postuló que una respuesta autoinmune, supuestamente originada en el timo, provocaría la secreción en exceso de una sustancia tímica responsable del defecto en la transmisión neuromuscular (Goldstein y Manganaro, 1971).

Se demostró que luego de la administración prolongada de un extracto de timo bovino a cobayos se produce un bloqueo de la transmisión neuromuscular (Golstein, 1968).

Posteriormente se observò que la Tpo purificada produce una disminuci3n de la amplitud de los potenciales de acci3n del m3sculo de 1 a 5 d3as despu3s de ser administrada a ratones (Goldstein, 1974).

Se ha estudiado la secuencia de amino3cidos completa de la Tpo y se determin3 que la hormona consiste en una 3nica cadena polipeptidica de 49 amino3cidos y un peso molecular de 5562 (Schlesinger y Goldstein, 1975; Audhya y col., 1981). Las secuencias aminoac3dicas de las timopoyetinas I y II difieren 3nicamente en tres residuos y debido a la gran similitud de sus efectos, se piensa que desde el punto de vista funcional se tratar3a de un mismo polip3ptido (Audhya y col., 1981).

Se ha sintetizado un tridecap3ptido correspondiente a la secuencia 29-41 de la Tpo y se demostr3 que al igual que la hormona entera, el p3ptido de trece amino3cidos induce la diferenciaci3n de los protimocitos a linfocitos T (Schlesinger y col., 1975).

M3s a3n, los efectos inmunol3gicos, es decir la inducci3n de la diferenciaci3n de protimocitos a timocitos y la inhibici3n del 3ltimo paso de la diferenciaci3n de las c3lulas B, son reproducidos por un pentap3ptido sint3tico correspondiente a las posiciones 32-36 de la Tpo y cuya secuencia aminoac3dica es Arg-Lys-Asp-Val-Tyr (Goldstein y col., 1979). Estos hallazgos sugirieron que el pentap3ptido, denominado timopentina (Tp5) corresponde al sitio activo de la Tpo y es utilizado con fines terap3uticos como sustituto de la Tpo.

Se demostr3, adem3s, que la Tp5 bloquea la transmisi3n neuromuscular en el rat3n (Audhya y col., 1984).

El mecanismo por el cual la Tpo y la TP5 bloquean la

transmisión a nivel de las sinapsis colinérgicas no se conoce todavía. Se ha demostrado que la Tpo se fija al receptor nicotínico de I. californica (Venkatasubramanian y col., 1986) y promueve la desensibilización del receptor (Revah y col., 1987).

I.6 LIGANDOS NICOTINICOS FARMACOLOGICAMENTE ACTIVOS

I.6.a Agonistas y antagonistas competitivos.

Los estudios de fijación de [³H]- α -isotoxina a fragmentos de membranas ricos en receptor nicotínico de I. marmorata y E. electricus (Weber y Changeux, 1974 a; b), y de [³H]-acetilcolina y [³H]-d-TC (Neubig y Cohen, 1979) permitieron demostrar que los agonistas y antagonistas nicotínicos y las toxinas curaremiméticas se unen a un sitio común en la molécula del receptor.

Neubig y Cohen (1979) demostraron, además, que la estequiometría de la fijación de d-Tc, acetilcolina y α -BuTx es $0.9 \pm 0.1 : 0.9 \pm 0.2 : 1$ respectivamente, lo que sugiere la existencia del mismo número de sitios para dichos ligandos.

Se ha observado que el receptor nicotínico posee un puente disulfuro en la vecindad del sitio de fijación de acetilcolina. En efecto, la respuesta de la electroplaca a la acetilcolina o a análogos es inhibida en presencia de bajas concentraciones del agente reductor ditioneitol (DTT) y se recupera mediante la aplicación de un agente oxidante tal como el ferricianuro de potasio o el 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato). Si luego de la reducción se agrega N-etilmaleimida, la inhibición es irreversible (Karlin y Bartels, 1966).

Weill y col. (1974) demostraron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS del receptor

nicotínico purificado del órgano eléctrico de T. californica tratado con el reactivo de afinidad 4-(N-maleimido)benciltri [³H]-metilamonio ([³H]MBTA) que únicamente la subunidad α aparece marcada en forma específica. Este resultado sugirió que la subunidad α contiene la totalidad o parte del sitio de fijación de acetilcolina. Esto fue corroborado posteriormente mediante el empleo de otro marcador de afinidad, la bromoacetilcolina (BAC) (Damle y col., 1978).

La molécula de receptor posee dos sitios de unión de acetilcolina. Esto fue sugerido por primera vez por Reynolds y Karlin (1978) considerando que el receptor purificado fija 8 nmoles de toxina/mg proteína (McNamee y col., 1975) y un peso molecular del monómero de 250.000, por ellos determinado. La existencia de dos sitios de unión para acetilcolina por molécula de receptor nicotínico fue confirmada por Neubig y Cohen (1979), mediante experimentos de fijación de [³H]-acetilcolina a fragmentos de membranas de Torpedo sp.

Ambos sitios no son equivalentes, ya que difieren en sus parámetros cinéticos de disociación de α -toxinas (Maelicke y col., 1977) y sólo la mitad de los sitios es marcada por reactivos de afinidad (Weill y col., 1974; Damle y col., 1978; Delegeane y McNamee, 1980). Más aún en preparaciones de vesículas ricas en receptor de T. californica tratadas con BAC y MBTA se observó que ambos sitios pueden ser activados y desensibilizados en forma independiente (Delegeane y McNamee, 1980).

La subunidad α madura posee 7 residuos de cisteína (Noda y col., 1982), y actualmente se está estudiando cuáles de estos residuos forman el puente disulfuro cercano al sitio de fijación de acetilcolina; las evidencias indican que serían los residuos de

cisteína 192 y 193 los involucrados en la formación de dicho enlace.

Kao y col. (1984) han demostrado por secuenciación de fragmentos de la subunidad α purificada, que únicamente los residuos de cisteína 192 y 193 son marcados en forma específica con [^3H]-MBTA. Estas observaciones son consistentes con el hecho de que estos residuos de cisteína se encuentran sólo en la subunidad α . Se ha demostrado, además, que los fragmentos proteolíticos que comprenden los residuos 173 a 204 (Wilson y col., 1985) y los fragmentos sintéticos que involucran los residuos 185 a 196 (Neumann y col., 1986) fijan α -BuTx y d-Tc.

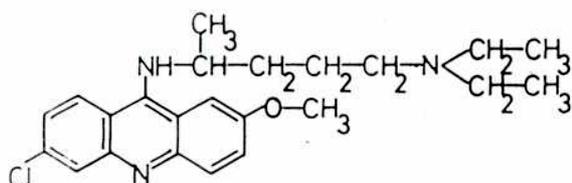
I.6.b Bloqueantes no competitivos

La respuesta de la membrana postsináptica a la acetilcolina en la unión neuromuscular y en las sinapsis del órgano eléctrico es bloqueada por una serie de compuestos, diferentes de los antagonistas nicotínicos clásicos, denominados bloqueantes no competitivos. Estos compuestos inhiben la respuesta a la acetilcolina uniéndose a un sitio distinto del sitio de fijación del agonista.

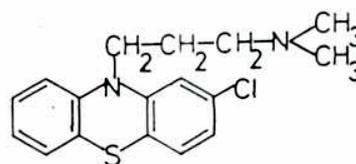
Son bloqueantes no competitivos del receptor nicotínico (Fig. I): los anestésicos locales aminados, los tranquilizantes mayores (clorpromazina), drogas antihelmínticas y antipalúdicas (quinacrina), alucinógenos (fenciclidina), la histriónicotoxina, toxina extraída de la piel de la rana colombiana Dendrobates histrionicus, el catión lipofílico trifenilmetilfosfonio, y compuestos que interactúan con los lípidos tales como detergentes y ácidos grasos, fosfolipasas, anestésicos generales y alcoholes.

FIGURA I

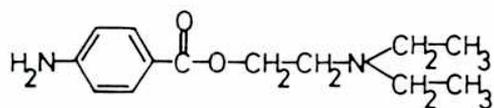
ESTRUCTURA DE ALGUNOS BLOQUEANTES NO COMPETITIVOS DEL
RECEPTOR NICOTINICO



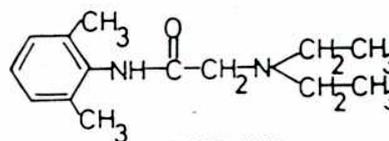
QUINACRINA



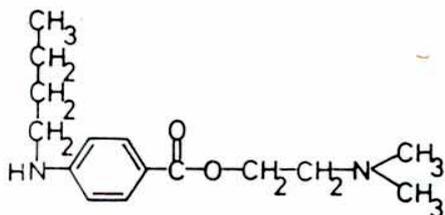
CLORPROMAZINA



PROCAINA



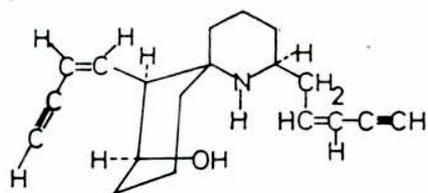
LIDOCAINA



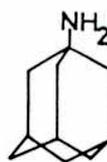
TETRACAINA



ACIDO ARAQUIDONICO



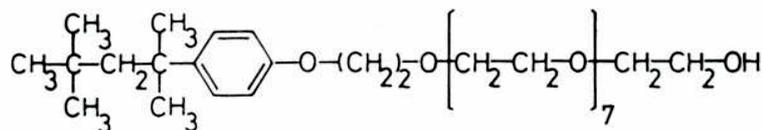
HISTRONICOTOXINA



AMANTADINA



FENCICLIDINA



TRITON X-100

I.6.b.i Probables mecanismos de acción de los bloqueantes no competitivos

Los experimentos electrofisiológicos en los cuales se estudió la actividad eléctrica del músculo sartorio de la rana en presencia de los agonistas acetilcolina o suberildicolina y de los bloqueantes no competitivos procaína y derivados de la lidocaína mediante el análisis de ruido (Katz y Miledi, 1975); salto de voltaje (Adams, 1977) y registros de canales iónicos (Neher y Steinbach, 1978), sugirieron que los bloqueantes no competitivos podrían actuar mediante un mecanismo estérico es decir bloqueando el canal cuando el mismo se encuentra abierto.

Koblin y Lester (1979) han demostrado por técnicas de salto de voltaje en electroplacas de E. electricus que a potenciales de membranas poco negativos (- 40 mV), la potencia de los bloqueantes no competitivos se correlaciona con su solubilidad en los lípidos y que a potenciales muy negativos (- 175 mV) dicha correlación no se observa. Los autores sugirieron que además del bloqueo directo, los bloqueantes no competitivos podrían inhibir la respuesta fisiológica en forma indirecta a través de los lípidos que rodean el receptor.

Neher y Steinbach (1978) propusieron un modelo alternativo al modelo estérico en el cual los bloqueantes no competitivos inhibirían el pasaje de iones por un mecanismo alostérico, es decir promoviendo una conformación del receptor en la cual el canal se encuentra cerrado.

Los estudios "in vitro" favorecen la hipótesis que los bloqueantes no competitivos actúan a través de un mecanismo alostérico.

En condiciones de equilibrio, los bloqueantes no

competitivos aumentan la fijación de [^3H]-acetilcolina. Cohen y col. (1974) demostraron que la prilocalina aumenta la afinidad para la acetilcolina en membranas ricas en receptor nicotínico de I. marmorata. Kato y Changeux (1976) obtuvieron resultados similares con histriónicotina y su derivado dihidrohistriónicotina.

Los experimentos de cinética permitieron demostrar que la velocidad de conversión lenta de un estado de baja afinidad por acetilcolina a uno de alta afinidad se acelera en presencia de bloqueantes no competitivos (Weiland y col., 1977; Heidmann y Changeux, 1979; Sine y Taylor, 1982).

También se ha demostrado que los bloqueantes no competitivos pueden cambiar el equilibrio entre los conformeros preexistentes del receptor en ausencia de acetilcolina y estabilizar la conformación D del receptor (Heidmann y Changeux, 1979; Young y Sigman, 1982; Sine y Taylor, 1982).

I.6.b.ii Sitios de unión de bloqueantes no competitivos

Los primeros estudios consistieron en probar si los bloqueantes no competitivos interactuaban o no con el sitio de fijación de la acetilcolina.

Weber y Changeux (1974 c) demostraron que los anestésicos locales disminuyen la respuesta máxima de la electroplaca de E. electricus a la acetilcolina y que las constantes de protección aparentes del sitio de acetilcolina, determinadas siguiendo la disminución de la velocidad inicial de fijación de [^3H]- α_1 -isotoxina a fragmentos de membranas de E. electricus y de I. marmorata en función de la concentración de anestésico local, son 1 ò 2 órdenes de magnitud mayores que las constantes de disociación aparentes de estos compuestos estimadas

"in vivo". Estos resultados sugirieron que los anestésicos locales se unen con baja afinidad al sitio de acetilcolina y que inhiben la despolarización de la electroplaca uniéndose a un sitio diferente.

Se han descrito sitios de unión para bloqueantes no competitivos en fragmentos de membranas ricos en receptor nicotínico utilizando una variedad de compuestos fluorescentes y marcados con isótopos radiactivos.

Grünhagen y Changeux (1976) demostraron que la quinacrina, ligando fluorescente con actividad farmacológica similar a la de un anestésico local, se fija a fragmentos de membranas ricos en receptor nicotínico de T. marmorata sólo en presencia de agonistas y que dicha fijación es inhibida por los anestésicos locales.

Los derivados de bloqueantes no competitivos marcados con radioisótopos utilizados son: [^3H]-trimetisoquina (Sobel y col., 1980), [^{14}C]-meproadifen (Krodel y col. (1979), [^3H]-perhidrohistrionicotoxina (Eldefrawi y col. 1977; 1978; 1980 a; Elliot y Raftery 1977, 1979; Aronstam y col., 1981; Oswald y Changeux, 1981 a) y [^3H]-fenciclidina (Kloog y col., 1980; Eldefrawi y col., 1980 b; Oswald y Changeux 1981 a; b).

Se observó que todos los bloqueantes no competitivos estudiados se fijan con alta afinidad (en el rango μM) al receptor nicotínico, que la fijación es inhibida por histrionicotoxina y anestésicos locales, y que los agonistas nicotínicos aumentan la afinidad de los bloqueantes no competitivos por su sitio de unión.

Eldefrawi y col. (1982) demostraron que la fijación de [^3H]-fenciclidina y de [^3H]-perhidrohistrionicotoxina es inhibida, en presencia de Carb 100 μM , por el adamantano y sus derivados,

siendo la amantadina y su sal de cloruro los inhibidores más potentes.

Sobel y col. (1980) han demostrado que las vesículas reconstituidas conteniendo receptor nicotínico purificado tienen propiedades de fijación de [^3H]-trimetisoquina similares a las membranas nativas. Esto indica que al menos parte de los sitios para bloqueantes no competitivos se encuentran en la molécula de receptor.

Con el fin de localizar el o los sitios de fijación de los bloqueantes no competitivos en la molécula del receptor, Oswald y Changeux (1981 a y b) utilizaron un derivado radiactivo de afinidad del anestésico local trimetisoquina (5-azido [^3H]-trimetisoquina). Los autores observaron que este compuesto se fija en forma selectiva a la subunidad δ del receptor y que la fijación es inhibida por un exceso de trimetisoquina e histrionicotoxina y estimulada por agonistas colinérgicos. Esto indicó que la subunidad δ lleva al menos parte del sitio de unión de los bloqueantes no competitivos.

La marcación covalente de la subunidad δ se realizó, también, por irradiación con luz ultravioleta de membranas ricas en receptor nicotínico en presencia de [^3H]-perhidrohistriónicotoxina, [^3H]-fenciclidina, [^3H]-trimetisoquina y [^3H]-clorpromazina (Oswald y Changeux, 1981 a). Se observó, en todos los casos, que la fijación es aumentada por Carb y es bloqueada por histrionicotoxina. La [^3H]-clorpromazina marca las 4 subunidades del receptor.

Heidmann y col. (1983 b) estudiaron el efecto de varios bloqueantes no competitivos en fragmentos de membranas ricas en receptor nicotínico de T. marmorata mediante la fijación del

agonista nicotínico fluorescente Dns-C₆-Cho y técnicas de cinética rápida. Los autores demostraron que todos los compuestos estudiados estabilizan al receptor en el estado D de alta afinidad por los agonistas y que pueden ser distinguidos en 2 categorías: a) bloqueantes no competitivos cuyos efectos son inhibidos por perhidrohistrioxicotina (fenciclidina, meproadifen y Tritón X-100) y b) bloqueantes no competitivos cuyos efectos no son inhibidos por perhidrohistrioxicotina (clorpromazina, trimetisoquina). En el mismo trabajo se estudió la fijación en equilibrio de bloqueantes no competitivos marcados y se demostró que los mismos se fijan a sitios distintos del sitio para acetilcolina. Se distinguieron, entonces, 2 tipos de sitios para bloqueantes no competitivos: a) un sitio de alta afinidad presente en una copia por monómero de receptor nicotínico y bloqueable por perhidrohistrioxicotina y b) una población de sitios de baja afinidad presentes en número de 10 a 30 por monómero e insensibles a perhidrohistrioxicotina. La comparación entre los estudios conformacionales y de fijación llevó a estos autores a concluir que el sitio de alta afinidad es responsable del efecto sensible a perhidrohistrioxicotina de los bloqueantes no competitivos sobre las transiciones conformacionales, mientras que los sitios de baja afinidad serían responsables de los efectos insensibles a dicha droga. Mediante experimentos de fijación de [³H]-trimetisoquina a membranas reconstituidas, los autores demostraron que el número de sitios de baja afinidad depende de la relación lípido-proteína, lo que sugiere que dichos sitios estarían ubicados en la interfase lípido-receptor.

Oswald y col. (1983) demostraron que las velocidades de asociación y disociación de [³H]-fenciclidina a membranas ricas en

receptor nicotínico de T. marmorata aumentan por preincubación con Carb y no por toxinas curaremiméticas, y que dichas velocidades aumentan mucho más cuando la fenciclidina se coincuba con el agonista. Estos resultados sugirieron que además de estabilizar el estado D, la fenciclidina se fija muy rápidamente al estado A en el cual el canal se encuentra abierto y acelera la transición al estado D.

Cox y col. (1985) estudiaron la marcación de los sitios para bloqueantes no competitivos en membranas ricas en receptor nicotínico de T. californica utilizando [^3H]-quinacrina azida y técnicas de cinética rápida. Los autores demostraron que la acetilcolina induce un estado susceptible de ser marcado y que la marcación es inhibida por los bloqueantes no competitivos proadifen, quinacrina, clorpromazina, histrionicotoxina y bupivacaína. Los autores concluyeron que debido a que el curso temporal de la marcación es mayor que el de apertura y cierre del canal, el receptor podría ser marcado en el estado de canal abierto o durante la etapa rápida de desensibilización. En el mismo estudio se determinó que la [^3H]-quinacrina azida marca la subunidades α y β ; y dentro de la subunidad α se marca un fragmento que contenido en el segmento M₁. Dicho fragmento (residuos 211-237) se encuentra muy próximo a los residuos de Cys 192 y 193 posiblemente involucrados en el sitio para acetilcolina. La gran proximidad entre ambos sitios permitiría explicar la interacción positiva y recíproca entre ellos (Karlin y col., 1986).

Giraudat y col. (1986) estudiaron la marcación covalente de [^3H]-clorpromazina a membranas de T. marmorata por fotoactivación en presencia de Carb. Se observó que las 4

subunidades se marcan. El análisis de aminoácidos de fragmentos de la subunidad δ demostrò que la [^3H]-clorpromazina se une específicamente al residuo Ser-262. Este residuo se encuentra dentro del segmento M $_2$ y los autores proponen que dicho segmento podría estar involucrado, al menos en parte, en la formación del canal iónico.

I.6.c La amantadina

1-adamantanamina (amantadina) es una amina primaria tricíclica de estructura simétrica (Fig. I).

La amantadina es una droga que tiene acción antiviral. Davies y col. (1964) demostraron que la amantadina inhibe la multiplicación del virus de la influenza de tipo A. A $_1$, A $_2$ y C y el tipo Sendai del parainfluenza. Estos estudios se realizaron "in vitro" en fibroblastos de pollo, células de riñón de mono y perro y en células amnióticas humanas, e "in vivo" en embriones de pollo y en el ratón. La droga no produce una inactivación directa del virus ni tampoco inhibe la adsorción del virus sobre los fibroblastos de pollo o eritrocitos, pero sí bloquea o disminuye la velocidad de penetración del virus a la célula, ya que un suero que contiene anticuerpos específicos contra el virus produce una inhibición viral más potente en presencia de la droga. En animales se observò que si la amantadina es administrada antes de la infección viral hay un aumento en el número de animales sobrevivientes y un aumento en el tiempo de vida de los animales afectados.

En el hombre, la amantadina administrada por vía oral ha sido utilizada en la profilaxis y en el tratamiento de la infección producida por el virus A $_2$. Su efectividad es discutida

(Litter, 1975 b).

Schlegel y col. (1982) demostraron por técnicas de inmunofluorescencia indirecta, por cuantificación de la síntesis de ARN dependiente del virus, por infección con virus marcado con [³H]-uridina y por microscopía electrónica que la amantadina inhibe la entrada del virus de la estomatitis vesicular a células de ratón en cultivo. Esta inhibición se produciría en el estadio de asociación del virus con regiones de la membrana celular recubiertas con clatrina.

La amantadina tiene, además, la propiedad de mejorar ciertas manifestaciones de la enfermedad de Parkinson. En esta enfermedad se produce una lesión en la sustancia negra acompañada de una disminución de la liberación de dopamina que, en condiciones normales, inhibe las neuronas del cuerpo estriado (Litter, 1975 b).

Grelak y col. (1970) demostraron que la amantadina aumenta la presión arterial en perros a los que se les inyecta previamente dopamina y sugirieron que la droga aumenta la liberación de dopamina de sitios de almacenamiento periféricos. Estos autores postularon que la amantadina podría tener un efecto similar en la liberación de dopamina en el sistema nervioso central lo que explicaría la eficacia de la droga en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

La amantadina tiene, además, efectos en la unión neuromuscular. Nastuk y col. (1976) estudiaron la acción de la amantadina en preparaciones de músculo esquelético de la rana. Los autores observaron que la amantadina disminuye en forma reversible la tensión isométrica en preparaciones estimuladas indirectamente a través del nervio y disminuye la amplitud de los potenciales

postsinápticos excitatorios y los potenciales de placa miniatura. La amantadina no produce despolarización de la membrana pero disminuye la despolarización inducida por Carb aplicada iontoforéticamente. Los autores concluyeron que la amantadina inhibe la transmisión neuromuscular reduciendo la respuesta de la membrana muscular a la acetilcolina.

En un estudio posterior, Albuquerque y col. (1978) demostraron que la amantadina en concentraciones $10^{-8}M$ y $10^{-4}M$ reduce la fijación de [3H]-perhidrohistrionicotina pero no afecta la fijación de [3H]-acetilcolina a fragmentos de membranas de I. ocellata. Estos resultados sugirieron que la amantadina ejerce su acción fijándose al canal y no al sitio de unión de la acetilcolina. Los autores confirmaron que la amantadina $10^{-4}M$ produce una disminución marcada de la despolarización inducida por acetilcolina aplicada iontoforéticamente en el músculo denervado de la rata. Mediante técnicas de voltaje impuesto, se observó que la amantadina a una concentración de $2 \times 10^{-4}M$ disminuye la amplitud de la corriente de placa en el músculo sartorio de la rana y, al igual que otras drogas que afectan el canal, reduce el tiempo de elevación y el tiempo medio de caída de dicha corriente, y modifica la influencia del potencial de membrana sobre la amplitud y el tiempo de caída de la corriente de placa.

Tsai y col. (1978) observaron los mismos efectos de la amantadina sobre las propiedades de conductancia de la membrana en preparaciones de músculo esquelético de la rata, y demostraron que la amantadina inhibe el eflujo de $^{22}Na^+$ estimulado por Carb de microsacos de Torpedo sp., no afecta la fijación de [3H]-acetilcolina y [3H]- α -BuTx pero inhibe la fijación de [3H]-perhidrohistrionicotina.

Warnick y col. (1982) estudiaron los efectos de la amantadina y compuestos derivados sobre las propiedades de conductancia iónica del músculo sartorio de la rana y sobre la fijación de [³H]-perhidrohistriónicotina y [³H]-acetilcolina a fragmentos de membranas de T. ocellata. Los autores interpretaron que la disminución de la amplitud de la corriente de placa representa un bloqueo de los canales cerrados mientras que el acortamiento del tiempo medio de caída representa el bloqueo del canal en su configuración abierta y que ambas reacciones ocurren en forma independiente.

No se han realizado aún estudios tendientes a establecer si la amantadina ejerce un efecto alostérico sobre el receptor nicotínico, similar al de otros bloqueantes no competitivos.

I.7 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO

I.7.a El concepto de reconstitución

La reconstitución es una estrategia experimental que se basa en el principio de que las funciones biológicas pueden ser mejor estudiadas si sus componentes individuales son purificados y recombinados en forma conveniente.

El objetivo principal de las técnicas de reconstitución es, entonces, la simplificación del sistema en estudio al mínimo número de componentes requeridos para su función.

La reconstitución de las funciones de transporte a través de la membrana se ha visto obstaculizada por la dificultad de aislar y purificar sistemas de transporte, generalmente insolubles en agua, sin ser dañados.

Las funciones de transporte requieren, además, la imposición de un orden o asimetría sobre el sistema. La proteína

transportadora debe ser introducida en la membrana en forma asimétrica de tal forma de mimetizar la asimetría de las membranas biológicas (Miller y Racker, 1979).

La función de una variedad de proteínas de membrana ha podido ser reconstituida en membranas artificiales (revisiones en Miller y Racker, 1979; McNamee y Ochoa, 1982; McNamee y col., 1986).

I.7.b Reconstitución del receptor nicotínico en liposomas

Bangham y colaboradores en el año 1965 demostraron que las dispersiones acuosas de fosfolípidos forman estructuras cerradas relativamente impermeables a los iones. Desde entonces los liposomas han sido ampliamente utilizados como sistemas modelo para el estudio de las membranas biológicas.

Los métodos de reconstitución de proteínas de membranas en vesículas lipídicas involucran la solubilización de la proteína y los lípidos con detergentes no desnaturalizantes y la posterior eliminación del detergente. Al reducirse la concentración del detergente por debajo de la concentración micelar crítica, la limitada solubilidad del lípido y de la proteína causa su agregación y formación de bicapas lipídicas con la proteína incorporada.

La función del receptor nicotínico fue reconstituida con éxito por primera vez por Epstein y Racker (1978). El receptor nicotínico fue extraído de membranas del órgano eléctrico de I. californica con colato de potasio al 2 % en presencia de 25 mg/ml de asolectina. La asolectina es una mezcla cruda de fosfolípidos y lípidos neutros extraída de la soja (Letters, 1964). La mezcla se centrifugó y el sobrenadante se dializó contra buffer sin colato

durante 16 a 18 horas para eliminar el detergente y permitir la formación de vesículas.

Los autores demostraron que el receptor nicotínico reconstituido mantiene intactas sus propiedades funcionales ya que el influjo de $^{22}\text{Na}^+$ a los liposomas es estimulado por Carb en forma dependiente de la dosis y bloqueado por los antagonistas nicotínicos $\alpha\text{-BuTx}$ y d-TC y por los bloqueantes no competitivos procaína y quinacrina. La preincubación del receptor nicotínico con Carb por más de 15 minutos inhibe el influjo indicando que el receptor nicotínico reconstituido exhibe el fenómeno de desensibilización. Los autores observaron, además, que la función del receptor nicotínico se pierde si no se incluyen lípidos adicionales durante la extracción del receptor.

Posteriormente, Haganir y col. (1979) incorporaron receptor nicotínico purificado del órgano eléctrico de T. californica en liposomas. El receptor reconstituido exhibe influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb y desensibilización de la respuesta. Los autores demostraron que en ausencia de lípidos durante la extracción, la concentración óptima de colato de sodio es 1 %. Los autores utilizaron distintos métodos de reconstitución: diálisis, dilución e incorporación a liposomas preformados por congelación-descongelación y sonicación, y observaron que las mayores respuestas se obtienen por el método de diálisis del detergente. Además se comprobó que se requiere la presencia de fosfolípidos exógenos en todos los pasos de la purificación para que el receptor nicotínico conserve sus propiedades de translocación iónica.

Se ha observado por técnicas de congelación y fractura que las preparaciones reconstituidas están formadas por vesículas

unilamelares de 400 nm de diámetro que contienen receptor y vesículas sin receptor de 20 a 80 nm de diámetro (Lindstrom y col., 1980).

El receptor nicotínico purificado y reconstituido en liposomas constituye un sistema que permite medir las propiedades de fijación de ligandos y de permeación iónica del receptor en la misma preparación. Por lo tanto resulta conveniente para realizar estudios de los efectos de drogas sobre las propiedades funcionales del receptor.

La función del receptor nicotínico se ha reconstituido también en membranas planas. Estas membranas se forman en la superficie de una pequeña abertura entre dos compartimientos acuosos. La proteína puede ser incluida en la suspensión de lípido antes de la formación de la membrana (Schindler y Quast, 1980) o puede ser incorporada a bicapas previamente formadas (Boheim y col., 1981).

Un paso importante en los experimentos de reconstitución en liposomas es la eliminación del detergente utilizado para extraer la proteína de la membrana. En el caso del receptor nicotínico la eliminación del detergente puede realizarse por diálisis (Epstein y Racker, 1978), dilución (Huganir y col., 1979) o filtración en geles (Huganir y Racker, 1982).

Recientemente se ha informado la utilización de un nuevo método para la reconstitución de receptores (Kremenetzky y Atlas, 1984; Aguilar y Ochoa, 1986) que no ha sido aplicado aún para la reconstitución del receptor nicotínico. Este método consiste en la precipitación por polietilenglicol (PEG) del receptor extraído y su inserción en vesículas lipídicas.

De esta forma se ha reconstituido el receptor

adrenérgico de tipo α_2 del cerebro de la rata y del ternero (Kremenetzky y Atlas, 1984). Utilizando una técnica similar, el receptor muscarínico de la zona atrial del corazón bovino se incorporó en liposomas de asolectina presentando propiedades similares al receptor en su membrana nativa (Aguilar y Ochoa, 1986; Pellegrino de Iraldi y col., 1986; Aguilar y col., 1987).

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Estudiar las principales propiedades bioquímicas y funcionales del receptor nicotínico del órgano eléctrico de Discopyge tschudii con el fin de establecer si presenta características similares al receptor nicotínico del órgano eléctrico de otras especies, particularmente del género Torpedo, ampliamente utilizadas para el estudio de esta proteína.
- 2) Estudiar aspectos de la desensibilización del receptor nicotínico, tales como los efectos del Ca^{2+} y de un pentapéptido, la timopentina, sobre dicho fenómeno.
- 3) Profundizar en el conocimiento sobre el mecanismo de acción del bloqueante no competitivo amantadina sobre el receptor nicotínico purificado y reconstituido en liposomas.
- 4) Estudiar la aplicación de la técnica de reconstitución por precipitación con polietilenglicol para la incorporación del receptor nicotínico, con el fin de obtener un mayor conocimiento sobre el funcionamiento del mismo en vesículas preparadas bajo distintas condiciones experimentales.

MATERIALES Y METODOS

III.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En los estudios del receptor nicotínico realizados en el presente trabajo se utilizaron ejemplares de la especie Discopyge tschudii de ambos sexos. Los animales, provistos por la Profesora M. B. Cousseau (Instituto de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP)), fueron capturados en las cercanías del puerto de Mar del Plata y transportados a Buenos Aires por avión en bolsas plásticas conteniendo agua de mar en cantidad suficiente.

Los animales se sacrificaron por desmedulamiento, luego de un período de 2 a 24 horas de recibidos. Los órganos eléctricos se disecaron inmediatamente, se pesaron, se cortaron en pequeños trozos y se congelaron a -70°C o en nitrógeno líquido hasta el momento de ser utilizados.

Las características de los animales utilizados en el presente trabajo se indican a continuación:

Sexo	Dimensiones (cm)	Peso del cuerpo (g)	Peso de los órganos eléctricos (g)
Machos	34 x 22-45 x 28	660-1230	212-382
Hembras	20 x 11-43 x 19	120-812	18-120

III.2 PREPARACION DE MEMBRANAS CONTENIENDO RECEPTOR NICOTINICO DE ORGANNO ELECTRICO

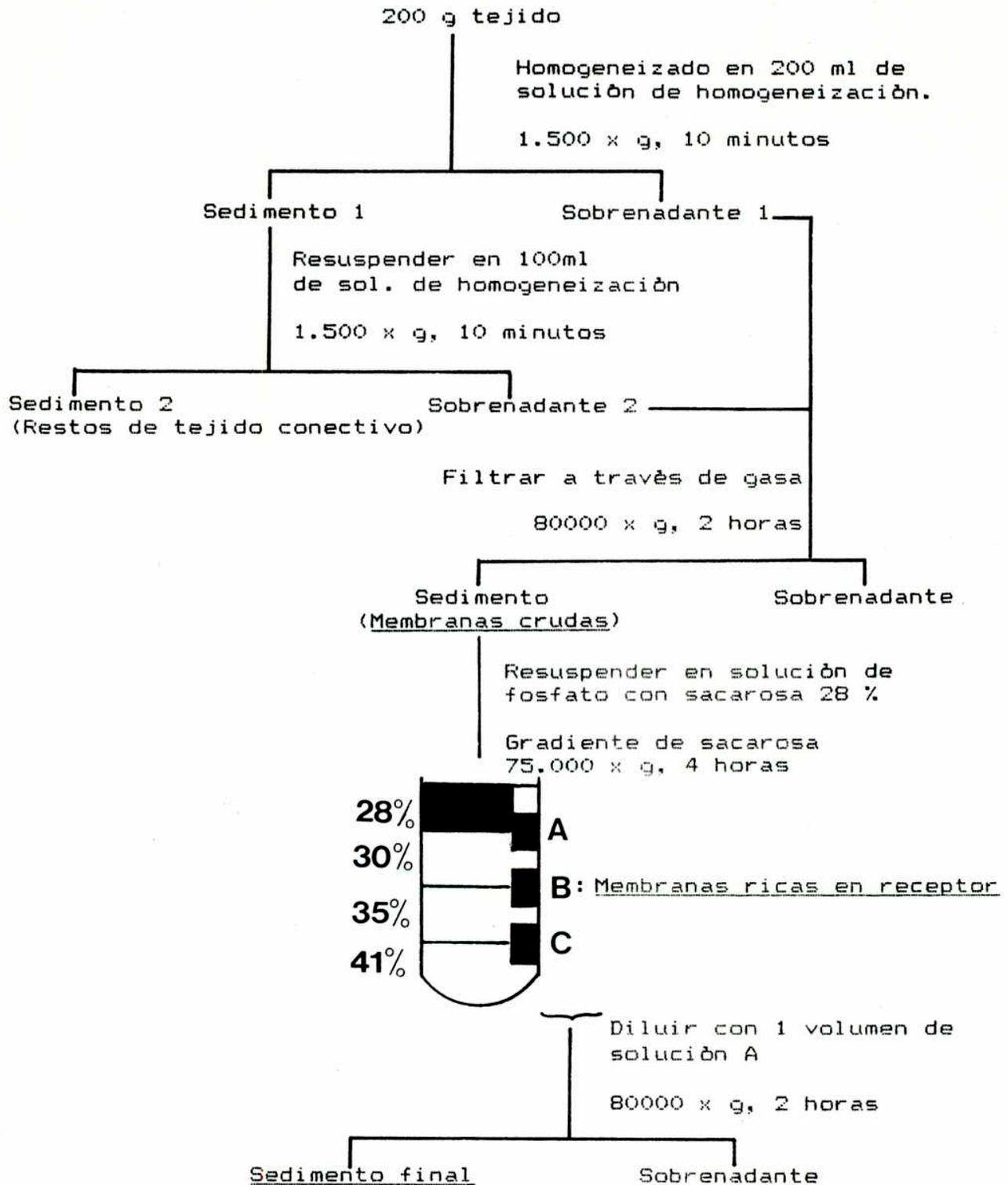
III.2.a Preparación de fracciones crudas de membranas

En cada preparación se descongelaron a 4°C 200 g de órgano eléctrico y se homogeneizaron en 200 ml de solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, iodoacetamida 10 mM, PMSF 0,1 mM, NaN₃ 0,02 %, pH 7,5 (solución de homogeneización) en un triturador de tejido Waring en 4 periodos de 30 segundos a máxima velocidad. El homogenato se centrifugó a 1.500 x g durante 10 minutos en un rotor SS34 (Sorvall) para eliminar el tejido conectivo. El sobrenadante resultante se filtró a través de 4 capas de gasa y se guardó a 4°C. El sedimento se resuspendió en 100 ml de solución de homogeneización y se centrifugó como se indicó anteriormente. El sobrenadante se filtró a través de la misma gasa. Ambos sobrenadantes se centrifugaron a 80.000 x g durante 2 horas en un rotor 30 (Spinco). El sedimento obtenido se resuspendió en 25 ml de NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, NaN₃ 0,02 %, pH 7,4 (solución A) y se congeló a -70°C o en nitrógeno líquido.

III.2.b Preparación de fracciones de membranas más purificadas

El sedimento resultante de la última centrifugación se resuspendió en 32 ml de solución reguladora de fosfato de sodio 10 mM, EDTA 0,1 mM, NaN₃ 0,02 %, pH 7,0 conteniendo sacarosa al 28 % (p/p). El material resuspendido se fraccionó en alícuotas de 7,6 ml, las cuales se colocaron sobre gradientes discontinuos de sacarosa 30 %, 35 % y 41 % (p/p) en la misma solución. Los gradientes se centrifugaron a 75.000 x g durante 4 horas en un

Preparación de membranas conteniendo receptor nicotínico



rotor SW 25 (Spinco).

Por este método se obtuvieron 3 fracciones de membranas que se denominaron A, B y C correspondientes a las capas de 30 %, 35 % y 41 % respectivamente. Las fracciones se recolectaron, se diluyeron con un volumen igual de solución A y se centrifugaron a 80.000 x g durante 2 horas. Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en solución A y se congelaron a -70°C o en nitrógeno líquido.

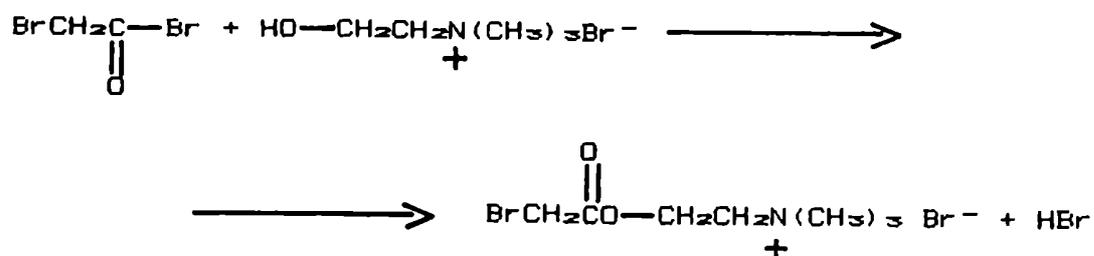
III.3 EXTRACCION Y PURIFICACION DEL RECEPTOR

III.3.a Solubilización del receptor

Las membranas (crudas o purificadas) preparadas a partir de 200 g de tejido eléctrico, se diluyeron con solución A y colato de sodio al 10 % (p/v) en solución A a una concentración final de proteína de 2 mg/ml y de colato de sodio de 1 %. La mezcla se agitó durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 80.000 x g durante 2 horas. El sobrenadante resultante se guardó a 4°C.

III.3.b Síntesis de bromoacetilcolina

La reacción de síntesis es la siguiente:



A 9,2 g (0,05 moles) de bromuro de colina sólido se agregaron 12,1 g (5,2 ml) (0,05 moles) de bromuro de bromoacetilo gota a gota y agitando en forma continua. La mezcla se enfrió en un baño de

hielo y se agitó durante una hora más. Se agregaron lentamente 38 ml de alcohol absoluto. El sólido se filtró por succión, se colocó en un matraz con 200 ml de isopropanol y se disolvió en un baño de agua caliente. La preparación se filtró a través de un embudo de vidrio. El material sólido se descartó y el líquido se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente y luego se colocó en hielo. Los cristales se filtraron y se secaron en vacío. La preparación de bromoacetilcolina (BAC) se guardó en desecador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

III.3.c Preparación de la columna de afinidad

Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Se mezclaron 25 ml de Affi Gel 401 con 25 ml de DTT 20 mM en solución reguladora Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, durante 20 minutos. El gel se empacó en una columna de 30 cm x 1,5 cm y se lavó con 5 volúmenes de NaCl 100 mM, fosfato de sodio 50 mM, NaN_3 0,02%, pH 7,0 (solución de lavado). El gel se resuspendió en la misma columna sin desempacar, se agregaron 150 mg de BAC y se agitó durante 10 minutos. La columna se dejó empacar y posteriormente se lavó con 3-4 volúmenes de solución de lavado. El gel se volvió a resuspender dentro de la misma columna, se agregaron 150 mg de iodoacetamida y se agitó durante 20 minutos. La columna se empacó nuevamente, se lavó con NaN_3 0,02% y se dejó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

III.3.d Purificación del receptor por cromatografía de afinidad

El sobrenadante obtenido luego de la extracción con colato de sodio se pasó a través de la columna de 15 ml de Affi-Gel 401 y BAC unida covalentemente, equilibrada previamente con 50 ml de solución A conteniendo colato de sodio al 1 % (p/v) y lecitina de soja (Asolectina) en una concentración de 2 mg/ml. La

velocidad de flujo fue de 1 ml/min. Inmediatamente después de pasar el sobrenadante, la columna se lavó con 100 ml de misma solución. La elución se realizó con 50 ml de Carb 10 mM disuelta en la misma solución. Se recogieron fracciones de 2 ml y se midió absorbancia a 280 nm. Las fracciones correspondientes al pico de absorbancia se reunieron, se agregó sacarosa para obtener una concentración 0,5 M y se congelaron a -70°C o en nitrógeno líquido.

III.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Aproximadamente 120 μg de receptor purificado se dializaron, utilizando una bolsa de diálisis (Spectrapor membrane, Spectrum Medical Industries INC., Los Angeles), contra 1.000 volúmenes de solución A durante 2 horas, con 2 cambios. La proteína se precipitó y se lavó con 9 volúmenes de acetona y se secó en vacío. Luego se agregaron 50 μl de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 10 mM, SDS al 2 % (p/v), pH 8,0 y la mezcla se incubó a 50°C durante 2 horas.

Una vez finalizada la incubación se tomaron alícuotas de 50 μg de proteína y se sembraron en geles de acrilamida 5,6 % -metilenbisacrilamida 0,21 % preparados, corridos y coloreados de acuerdo a Karlin y Cowburn (1973). El peso molecular promedio para cada una de las subunidades se calculó comparando con muestras de fosforilasa, albúmina de suero bovino (BSA) y hormona de crecimiento bovina corridas en forma paralela.

Las bandas obtenidas se cortaron y se secaron en vacío para analizar posteriormente su composición en aminoácidos.

III.5 ANALISIS DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS SUBUNIDADES

Las muestras se hidrolizaron utilizando fenol 1 mg/ml y β -mercaptoetanol al 0,5 % (p/v) en HCl en tubos sellados al vacio a 110°C durante 20 horas. La determinación de aminoácidos del material hidrolizado se realizó en un analizador de aminoácidos Beckman 119 CL.

III.6 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR EN LIPOSOMAS POR EL METODO DE DIALISIS DE COLATO

Se realizó a partir de membranas conteniendo receptor y de receptor purificado por el método descrito por Dalziel y col. (1980).

III.6.a Reconstitución a partir de membranas

La fracción de membranas conteniendo receptor se diluyó con solución A hasta una concentración de proteína de 2 mg/ml. Se agregó colato de sodio para tener una concentración de 1 % (p/v). La mezcla se agitó durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 80.000 \times g durante 2 horas. El sobrenadante resultante se guardó a 4°C.

Se preparó una suspensión de asolectina, para lo cual se pesaron 168 mg de dicho lípido y se agregaron 2 ml de colato de sodio 4,16 % (p/v) en solución A. La mezcla se sonicó bajo nitrógeno en un sonicador de baño Kerry a una frecuencia de 50 kHz durante 15 minutos. Se mezclaron 0,7 ml del extracto (0,92 mg de proteína) con 0,3 ml de la suspensión de lípido de forma tal que la concentración final de colato de sodio fuera de 2 %, la relación lípido-proteína de 30 (p/p) y la concentración de lípido 33 mM. La mezcla se dializó durante 48 horas contra 1.000

volúmenes de solución A previamente gaseada con nitrógeno por 10-15 minutos, con 3 cambios.

III.6.b Reconstitución a partir de receptor purificado

Se mezclaron 0,7 ml de receptor purificado (0,2 mg de proteína) con 0,3 ml de una suspensión de asolectina preparada con 84 mg de lípido en 2 ml de colato de sodio 4,16 % y sonicada como se explicó anteriormente. La relación lípido-proteína en este caso fue 62,5 (p/p) y la concentración de lípido 16 mM. La mezcla se dializó como se detalló anteriormente.

En ambos casos el material reconstituido se congeló a -70°C o en nitrógeno líquido y se descongeló en hielo antes de realizar los experimentos.

III.7 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR EN LIPOSOMAS POR EL METODO DE PRECIPITACION CON PEG

III.7.a Procedimiento de reconstitución

Se realizó de acuerdo a una modificación del método descrito por Aguilar y Ochoa (1986).

El receptor purificado se dializó contra 300 volúmenes de colato de sodio al 1 % en solución A durante 48 horas, con 3 cambios, para eliminar la Carb empleada para eluir el receptor de la columna de afinidad. Se preparó una suspensión de asolectina 56 mM mediante la sonicación de 45 mg de lípido en 1 ml de colato de sodio al 5% en solución A. La suspensión se mezcló con 2,8 ml de receptor (0,56 mg de proteína) de tal forma que la concentración final de colato fuera 2 % y la relación lípido-proteína 90 (p/p). La mezcla se colocó en un baño a 37°C durante 1-1,5 minutos y se

agregò un volùmen igual de PEG al 50 % en agua destilada. Se agitò con una varilla por 1-1,5 minutos en el mismo baño. La preparaciòn se dejò a 0°C durante 5 minutos y posteriormente se agregaron 4-6 volùmenes de soluciòn A muy lentamente agitando en forma continua con una varilla. La mezcla se centrifugò a 80.000 x g durante 1 hora. El sedimento resultante se lavò 2 ò 3 veces con 3 ml de agua destilada fria, se resuspendiò en 6 ml de soluciòn A y se centrifugò a 100.000 x g durante 30 minutos. El sedimento obtenido se resuspendiò en 1 ml de soluciòn A.

III.7.b Purificaciòn de las muestras de PEG

En algunos experimentos de reconstituciòn se utilizaron muestras de PEG purificado. La purificaciòn se realizò de acuerdo al mètodo de Honda y col. (1981). Se disolvieron 10 g de PEG en 80 ml de cloroformo y se precipitaron agregando 2 litros de èter etilico muy lentamente. La muestra se dejò decantar durante una noche y se filtrò a travès de papel de filtro en un embudo de tipo Buchner. El precipitado se evaporò bajo nitrògeno y al vacio y se guardò a temperatura ambiente hasta su utilizaciòn. A partir de 10 g de PEG se obtuvieron 9 g de material purificado.

III.8 PRUEBAS DE LA INCORPORACION DEL RECEPTOR A LIPOSOMAS

Se siguiò la tècnica descrita por Popot y col. (1981). Las muestras conteniendo 5-6 µg de proteina se incubaron con 16 pmoles de [¹²⁵I]-α-BuTx (actividad especifica 16-17 µCi/µg) en un volumen total de 200 µl durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego de la incubaciòn la mezcla se pasò a travès de una columna de Bio-Gel A 15m de 38 ml (1 x 49 cm). La velocidad de flujo fue de 0,25 ml/min. La eluciòn se realizò con 120 ml de soluciòn A. Se

recogieron fracciones de 1 ml y se midió la actividad de ^{125}I en un contador de centelleo sólido y la absorbancia a 450 nm.

III.9 ANALISIS DE LA FUNCION DEL RECEPTOR

III.9.a Fijación de ^{125}I - α -BuTx

III.9.a.i Titulación de la solución de ^{125}I - α -BuTx

Las soluciones de ^{125}I - α -BuTx se titularon utilizando receptor unido a membranas (fracción B) o con receptor purificado reconstituido en liposomas, con el fin de calcular el porcentaje de radiactividad correspondiente a moléculas de toxina capaces de unirse al receptor (Weber y Changeux, 1974 a). Normalmente un 60-75% de la radiactividad fue retenida por un exceso de receptor. Las preparaciones que presentaron valores menores de 50 % de moléculas activas de toxina fueron descartadas.

III.9.a.ii Fijación de ^{125}I - α -BuTx en equilibrio

Se realizó de acuerdo al método descrito por Schmidt y Raftery (1973), el cual se basa en el diferente punto isoelectrico de la α -BuTx (9,2) y del complejo toxina-receptor (4,9).

Los ensayos se realizaron incubando aproximadamente 2 pmoles de sitios en 50 μl de una solución NaCl 100 mM, MOPS 10 mM, Tritón X-100 0,2%, pH 7,4 (solución NMT₁₀₀) con 8 pmoles de ^{125}I - α -BuTx en 50 μl de NMT₁₀₀, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 5 ml de NaCl 10 mM, MOPS 10 mM, Tritón X-100 0,2%, pH 7,4 (solución NMT₁₀) y se filtró a través de dos filtros DEAE-celulosa (DE81, Whatman) previamente lavados con 4 ml de NMT₁₀. Para la filtración se utilizó una caja de acrílico de 10 bocas conectada a una bomba de vacío. Los filtros se

lavarón dos veces con 12 ml de solución NMT₁₀₀, se colocaron en tubos de plástico y se midió la radiactividad de los mismos en un contador de centelleo sólido.

La fijación inespecífica se determinó incubando las muestras con α -CTX o α -BuTx no radiactiva 1 μ M durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de realizar el ensayo de fijación de [¹²⁵I]- α -BuTx.

Para determinar la actividad retenida en los filtros en forma inespecífica se incubaron 50 μ l de NMT₁₀₀ con 50 μ l de la solución de toxina y se filtró como fue explicado anteriormente.

Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron en pmoles o nmoles de [¹²⁵I]- α -BuTx unidos / mg de proteína.

III.9.b Evaluación de los estados de afinidad del receptor

III.9.b.1 Evaluación cualitativa de los estados de afinidad

El proceso de desensibilización se puede correlacionar con el desplazamiento del receptor de un estado de baja afinidad a un estado de alta afinidad para el agonista (Weber y col., 1975; Weiland y col., 1976; 1977; Quast y col., 1978; Weiland y Taylor, 1979).

Como se explicó anteriormente las toxinas curaremiméticas y los agonistas nicotínicos se fijan al receptor en forma mutuamente excluyente.

La asociación de los agonistas al receptor nicotínico es una reacción controlada por difusión, mientras que la velocidad de fijación de toxina es intermedia. Por lo tanto se puede suponer que durante el curso inicial de la reacción de fijación de toxina medida en presencia del agonista, la interconversión entre los

dos estados puede ser despreciada si $[R]$ es baja y $[R] \ll [\text{toxina}]$ (McNamee y col., 1986).

En presencia del agonista, la constante de velocidad de fijación de toxina disminuye debido a la ocupación de algunos sitios por el agonista. Si el receptor se preincuba con el agonista, el equilibrio entre los estados de baja y de alta afinidad es modificado y se restablece un nuevo equilibrio con más conformeros en el estado de alta afinidad y menos en el estado de baja afinidad. Es decir que luego de la preincubación, la constante de velocidad de fijación de toxina disminuye más aún debido al mayor número de moléculas de receptor en estado de alta afinidad para el agonista que se traduce en un menor número de sitios disponibles para la toxina.

Para evidenciar los desplazamientos entre estados de baja y de alta afinidad, se realizaron experimentos en los cuales se midió la velocidad de fijación de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ como fue descrito por Walker y col. (1981 a).

La velocidad de fijación se midió en tres condiciones:

- a) Control: sin Carb.
- b) Coincubación con Carb.
- c) Preincubación con Carb.

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en la siguiente solución sin detergente: fosfato de sodio 10 mM, NaCl 100 mM, BSA 0,5 mg/ml, pH 7,0 (solución TIB-BSA). La concentración de sitios que fijan toxina fue 5 nM y la de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ 30 nM; en estas condiciones la reacción es de primer orden con respecto a la concentración de receptor.

a) Curva control: se incubaron 10 μl de membranas (3,6 pmoles de sitios) con 100 μl de solución de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ (21,6 pmoles) y

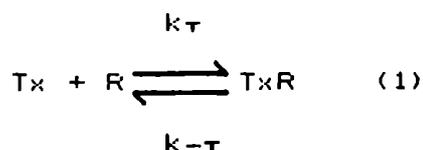
610 μl de TIB-BSA. La reacción se inició al agregar las membranas. Se tomaron alícuotas de 100 μl para filtrar a 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0 y 60 minutos (equilibrio).

b) Curva de coincubación: se incubaron 10 μl de membranas (3,6 pmoles) con 100 μl de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ (21,6 pmoles), 10 μl de Carb $7,2 \times 10^{-4}\text{M}$ (concentración final 10 μM) y 600 μl de TIB-BSA. Se tomaron alícuotas de 100 μl para filtrar a los mismos tiempos que en el caso de la curva control.

c) Curva de preincubación: se incubaron 30 μl de membranas con 30 μl de Carb $2,0 \times 10^{-4}\text{M}$ durante 30 minutos a 0°C . Luego se agregaron 20 μl de las membranas preincubadas a un medio conteniendo 100 μl de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ (21,6 pmoles), 10 μl de Carb $7,0 \times 10^{-4}\text{M}$ y 590 μl de TIB-BSA. Se tomaron alícuotas de 100 μl para filtrar a 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0 y 60 minutos (equilibrio).

Cálculo de la constante de velocidad

La reacción entre la toxina y el receptor se puede representar de la siguiente manera:



donde

k_r = constante de asociación

k_{-r} = constante de disociación

y la velocidad de asociación se expresa como:

$$v = k_r [\text{Tx}] [\text{R}] - k_{-r} [\text{TxR}] \quad (2)$$

Suponiendo que la toxina se fija en forma reversible a una clase de sitios homogéneos y no interactuantes, las ecuaciones de conservación son las siguientes:

$$[Tx] = [Tx_0] - [TxR] \quad (3)$$

$$[R] = [R_0] - [TxR] \quad (4)$$

donde

$[Tx]$ = concentración de toxina

$[Tx_0]$ = concentración inicial de toxina

$[R]$ = concentración de receptor

$[R_0]$ = concentración inicial de receptor

$[TxR]$ = concentración del complejo toxina-receptor

Al comienzo de la reacción, $[TxR]$ es baja comparada con $[R]$ y $[Tx]$ y además el valor de k_{-r} es muy pequeño. En consecuencia en los primeros minutos de reacción la ecuación (2) se puede simplificar:

$$v = -\frac{d[Tx]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = \frac{d[TxR]}{dt} = k_r [Tx] [R] \quad (5)$$

Reemplazando en (5) los valores de $[Tx]$ y $[R]$ de (3) y (4):

$$\frac{d[TxR]}{dt} = k_r ([Tx_0] - [TxR]) ([R_0] - [TxR]) \quad (6)$$

Reagrupando en (6)

$$\frac{d[TxR]}{([Tx_0] - [TxR]) ([Ro] - [TxR])} = k_{\tau} dt \quad (7)$$

Integrando la ecuación diferencial (7) entre t_0 y t

$$\ln \frac{[Ro] ([Tx_0] - [TxR])}{[Tx_0] ([Ro] - [TxR])} = ([To] - [Ro]) k_{\tau} t \quad (8)$$

La variación del primer miembro de (8) es lineal con respecto al tiempo y la recta posee una pendiente

$$([To] - [Ro]) k_{\tau}$$

Una manera más sencilla de calcular k_{τ} (que es la utilizada en el presente trabajo), consiste en hacer la reacción entre la toxina y el receptor de pseudoprimer orden, es decir colocando toxina en exceso de modo que la reacción sea de primer orden con respecto a la concentración de receptor.

Como se coloca toxina en exceso, la $[Tx]$ se considera constante en el curso de la reacción y la ecuación (5) resulta:

$$v = -\frac{d[R]}{dt} = k'_{\tau} [R] \quad (9)$$

donde

$$k'_{\tau} = k_{\tau} [Tx] = \text{constante de velocidad de pseudoprimer orden}$$

Reagrupando en (9)

$$-\frac{d[R]}{[R]} = k' \tau dt \quad (10)$$

Integrando (10) entre t_0 y t

$$-\ln \frac{[R]}{[R_0]} = k' \tau t \quad (11)$$

Reemplazando en (11) el valor de $[R]$ de (4)

$$-\ln \frac{[R_0] - [TxR]}{[R_0]} = k' \tau t \quad (12)$$

La ecuación (12) se calcula a partir de los resultados experimentales de la siguiente manera:

$[R_0] = \text{cpm}_e = \text{cpm}$ correspondientes a la reacción en equilibrio (60 minutos).

$[TxR] = \text{cpm}$ correspondientes a cada tiempo t de reacción (tomados entre 0,5 y 2 minutos para minimizar el efecto de la desensibilización).

La ecuación (12) se puede expresar, entonces:

$$-\ln \frac{\text{cpm}_e - \text{cpm}_t}{\text{cpm}_e - \text{cpm}_b} = k' \tau t \quad (13)$$

donde cpm_b corresponde a la radiactividad que queda retenida a los

filtros en ausencia de receptor. En el numerador no es necesario restar $c_{pm\delta}$ pues se anula.

La pendiente de la curva (13) es $k^* \tau$ y su dimensión es seg^{-1} .

Las rectas en todos los casos fueron ajustadas por regresión lineal. Las curvas ajustadas con coeficientes de correlación menores a 0,70 fueron descartadas.

La constante de segundo orden (k_{τ}) se calculó como:

$$k_{\tau} = \frac{k^* \tau}{[Tx_0]}$$

sus dimensiones son $\text{seg}^{-1} \text{M}^{-1}$.

III.9.b.ii Evaluación cuantitativa de los estados de afinidad

Este ensayo se realizó para determinar las constantes de baja (K_1) y de alta (K_2) afinidad para agonistas.

Estas constantes se pueden medir por medio de dos ensayos:

- a) Fijación de [^3H]-acetilcolina (Neubig y Cohen, 1979).
- b) Competición entre Carb y α -BuTx por el sitio de fijación (Walker y col., 1981 a).

El último método es el que se utilizó en el presente trabajo.

Para la determinación de K_1 se realizó una curva de velocidad de fijación de [^{125}I]- α -BuTx como fue explicado para la determinación cualitativa de los estados de afinidad del receptor y una familia de curvas de coincubación del receptor con toxina y Carb. Las concentraciones de Carb utilizadas fueron 0,1 μM , 1,0

μM , $10 \mu\text{M}$ y $30 \mu\text{M}$ y los tiempos de medición fueron 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 minutos (para minimizar el efecto de desensibilización).

Para la determinación de la K_2 se realizó también una curva de velocidad de fijación de toxina en ausencia de Carb y una familia de curvas de coincubación con toxina y Carb, pero las membranas en este caso se incubaron previamente con Carb para llevar el receptor al estado desensibilizado. Así, las membranas ($5 \mu\text{M}$ sitios) se incubaron con Carb $10 \mu\text{M}$ a 0°C durante 30 minutos. Luego se realizó una dilución 1:15 con TIB-BSA e inmediatamente se tomó una alícuota de $10 \mu\text{l}$ ($3,6 \text{ pmoles}$ de sitios) y se agregó a un medio conteniendo $100 \mu\text{l}$ de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ ($21,6 \text{ pmoles}$) y $10 \mu\text{l}$ de Carb en TIB-BSA (vol. final $720 \mu\text{l}$). Este procedimiento permitió diluir 1000 veces la Carb utilizada durante la preincubación. Las concentraciones finales de Carb utilizadas fueron: $0,01 \mu\text{M}$, $0,03 \mu\text{M}$, $0,10 \mu\text{M}$, $0,30 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$. Se tomaron alícuotas de $100 \mu\text{l}$ para filtrar a 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 minutos.

Cálculo de las constantes de afinidad

El tratamiento de los datos para el cálculo de K_1 y K_2 fue el mismo. Las curvas de fijación de toxina en función del tiempo se ajustaron por regresión lineal y se calcularon las pendientes de dichas curvas. El coeficiente de correlación en todos los casos fue mayor de 0,70. Luego se construyeron curvas de pendiente / pendiente máx. (es decir la pendiente para cada valor de Carb / pendiente en ausencia de Carb) en función del logaritmo de la concentración de Carb. En este caso no fue necesario calcular las constantes de velocidad de pseudoprimer orden en ausencia de Carb ($k'\tau_{\text{máx}}$) y en presencia de Carb ($k'\tau$), ya que se ha demostrado que el cociente $k'\tau / k'\tau_{\text{máx}}$ es igual al cociente entre las pendientes calculadas a partir de los gráficos

de fijación de toxina en función del tiempo (Walker y col., 1981 a).

Las constantes de afinidad se calcularon a partir del valor del logaritmo de la concentración de Carb correspondiente a pendiente / pendiente máx = 0,5.

Para el caso más simple de fijación competitiva, los gráficos semilogarítmicos de la inhibición de la fijación de α -BuTx por cantidades crecientes de Carb pueden ser ajustados a curvas teóricas obtenidas de la ecuación (1) para la fijación competitiva a sitios idénticos y no interactuantes (Quast y col., 1978).

$$\frac{k}{k_{\max}} = \frac{1}{1 + \text{Carb}/K} \quad (1)$$

III.9.b.iii Curso temporal de las transiciones de afinidad

La información obtenida mediante los ensayos cualitativos y cuantitativos de los estados de afinidad del receptor se completó mediante el estudio del curso temporal de dichas transiciones, el cual se realizó de acuerdo a Walker y col. (1981 a).

Se midió la velocidad de fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ en dos condiciones:

a) Coincubación con Carb: se incubaron 10 μl de membranas (3,6 pmoles de sitios) con 100 μl de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ (21,6 pmoles), 10 μl Carb $7,2 \times 10^{-4}\text{M}$ y 600 μl TIB-BSA, a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 100 μl para filtrar a 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 minutos.

b) Preincubación con Carb: se incubaron 10 μl de membranas (3,6

pmoles de sitios) con 10 μ l Carb $7,2 \times 10^{-4}$ M y 600 μ l TIB-BSA por 1, 2, 5, 10 y 20 minutos. Al cabo de dichos tiempos se agregaron 100 μ l de 125 I $-\alpha$ -BuTx (21,6 pmoles) y se midi3 la fijaci3n de toxina a 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 minutos.

La curva de coincubaci3n con Carb corresponde al control (tiempo de desensibilizaci3n cero).

Las curvas de fijaci3n de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ en funci3n del tiempo se ajustaron por regresi3n lineal, y fueron tomadas en cuenta solo aqu3llas que presentaron un coeficiente de correlaci3n mayor que 0,70.

En III.9.c.iv se describe otro m3todo para medir la desensibilizaci3n del receptor nicot3nico.

III.9.c Medic3n del influjo i3nico mediado por el receptor nicot3nico

La funci3n de translocaci3n de iones del receptor se midi3 a trav3s del influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb.

III.9.c.i Preparaci3n de las columnas de intercambio cati3nico

Se realiz3 de acuerdo a lo descripto por Epstein y Racker (1978).

La resina Dowex 50W-X8 (malla 50-100) fue convertida a la forma Tris como fue descripto por Gasko y col. (1976). La resina (500 g) se lav3 con agua destilada hasta claridad. Luego se agregaron 500 ml de agua destilada y 220 g de Tris y la mezcla se agit3 a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, la resina se lav3 extensamente (20 a 25 veces con 4 litros de agua destilada y por 3ltimo con 4 litros de agua bidestilada). Se control3 que el pH final fuera aproximadamente 8,0.

La resina se colocò en columnas plàsticas de 2 ml (QSY, Isolab). Las columnas conteniendo la resina se equilibraron con 3 ml de una soluciòn de sacarosa 170 mM, BSA 3,3 mg/ml, NaN₃ 0,02% y se colocaron en hielo hasta su utilizaciòn.

III.9.c.ii Mediciòn del influjo de ⁸⁶Rb⁺

Se realizò de acuerdo a Walker y col. (1982). Se utilizò ⁸⁶Rb⁺, que puede reemplazar al ⁴²K⁺ (Palfrey y Littauer, 1976) y tiene la ventaja de tener un periodo de semidesintegraciòn mäs largo. En cada ensayo, 50-100 µl de membranas se mezclaron con 10 µl (2-4 µCi) de ⁸⁶Rb⁺ (actividad especifica 0,3-1,0 Ci/g) y 10 µl de Carb 7×10^{-3} M ò $1,2 \times 10^{-2}$ M (concentraciòn final 1 mM). Para medir el influjo en ausencia del agonista se colocaron 10 µl de soluciòn A en lugar de Carb. Cuando se midiò el influjo en membranas nativas, la concentraciòn de proteínas en las muestras no fue mayor de 2 mg/ml para evitar que se bloqueen las columnas.

La reacciòn se llevò a cabo a 0°C por 10 segundos (o el tiempo especificado en cada caso). Se tomaron 50-100 µl de la mezcla de reacciòn y se filtraron a travès de las columnas de intercambio catiònico. Las columnas se lavaron inmediatamente con una soluciòn de sacarosa 175 mM, NaN₃ 0,02%. Los cationes externos quedan retenidos en las columnas y los cationes atrapados en los liposomas, por poseer estos últimos una carga neta negativa, no son retenidos en las mismas.

El material eluido de las columnas se recogió en viales de plàstico y la radiactividad se midiò en un contador de centelleo líquido en ausencia de líquido centellador con un ancho de ventana 0-999. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El influjo de ⁸⁶Rb⁺ estimulado por Carb se calculò como

la diferencia entre el influjo en presencia de Carb (Carb⁺) y el influjo medido en su ausencia (Carb⁻) y los resultados se expresaron en pmoles o nmoles ⁸⁶Rb⁺/nmol receptor o en cpm.

El influjo de iones medido por este método corresponde a una respuesta integrada y representa el volumen interno de liposomas conteniendo receptor funcional en presencia de altas concentraciones de agonistas. Debido a que durante el tiempo de ensayo se produce la activación e inactivación de la respuesta (el tiempo de influjo real está en el orden de los msec), se considera a esta ensayo como un indicador cualitativo de la actividad del receptor nicotínico.

III.9.c.iii Determinación del volumen interno de las vesículas

El volumen interno total de las preparaciones de vesículas se determinó incubando 100 µl de membranas (100 pmoles de sitios) con 10 µl (2-4 µCi) ⁸⁶Rb⁺ por 48 horas a 4°C para asegurar un equilibrio completo entre los iones externos e internos. Luego de la incubación, las muestras se filtraron como fue explicado anteriormente.

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en nl/µmol lípido exógeno.

III.9.c.iv Curso temporal del proceso de inactivación (desensibilización) de la respuesta del receptor

Un método más sensible para medir el curso temporal del proceso de desensibilización, consiste en determinar la velocidad de inactivación de la respuesta del receptor nicotínico, como fue descrito por Walker y col. (1981 b; 1982).

Se incubaron 63 µl de membranas reconstituidas con 7 µl

de Carb $5 \times 10^{-5}M$ (o la concentración indicada en cada caso) por 5, 10, 15, 20, 30 y 60 segundos. Inmediatamente después se realizó un ensayo de influjo de $^{86}Rb^+$ a 10 segundos colocando 50 μl de la mezcla de preincubación con 10 μl ($2-4 \mu Ci$) $^{86}Rb^+$ y 10 μl de Carb $7 \times 10^{-5}M$. El tiempo cero de preincubación se determinó incubando 63 μl de membranas con 7 μl de solución A y midiendo el influjo de $^{86}Rb^+$ a 10 segundos.

A todos los valores de influjo medidos en presencia de Carb se les restó el valor de influjo medido en ausencia de Carb. Los ensayos se hicieron por duplicado o por triplicado.

Para obtener una medida de la velocidad de inactivación de la respuesta del receptor, se calculó el tiempo empirico medio de inactivación. Este parámetro se calculó haciendo el gráfico semilogarítmico de la respuesta en función del tiempo de preincubación. Las curvas fueron ajustadas por regresión lineal.

El tiempo empirico medio de inactivación se obtuvo de la ecuación de las rectas como el valor de tiempo correspondiente al 50% de la respuesta máxima (tiempo cero de preincubación).

III.10 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACE

Se realizó de acuerdo al método descrito por Ellman y col. (1961).

La reacción se llevó a cabo en solución reguladora de fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0, utilizando 20 μl de acetiltiocolina (ATC) 75 mM como sustrato y 100 μl de DTNB 0,01 M, en un volumen final de 3 ml a temperatura ambiente. La velocidad inicial de la reacción se determinó midiendo la absorbancia a 412 nm, cada 15 segundos durante 3 minutos.

Las determinaciones se hicieron por duplicado o

triplicado. La variación de absorbancia por minuto (Δ Abs/min) se calculó como la pendiente de la recta promedio.

La actividad específica se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Act. esp.} = \frac{\Delta \text{ Abs/min}}{13,6} \times \frac{\text{Vol cubeta } (\mu\text{l})}{\text{Vol alícuota } (\mu\text{l}) / [\text{prot}]}$$

donde 13,6 es el coeficiente de extinción molar. La actividad específica se expresó en $\mu\text{moles ATC transformados} / \text{min.mg}$ proteína.

III.11 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas de las preparaciones se determinó por el método descrito por Lowry y col. (1951) utilizando BSA como patrón.

Para determinar la concentración de proteínas de preparaciones reconstituidas se utilizó el método descrito por Hess y Lewin (1965). Las muestras se hidrolizaron con 200 μl de HONa 0,5 N, a 37 °C durante toda la noche. Luego se realizó el ensayo de proteínas, se agregó 1 ml de Cl_3CH , se centrifugó a 2.500 RPM durante 10 minutos y se leyó absorbancia a 750 nm en la fase superior.

III.12 DROGAS UTILIZADAS

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Tris-base, EDTA, EGTA, iodoacetamida, PMSF, DTT, colato de sodio, Triton X-100, BSA, PEG, acetiltiocolina (ioduro), DTNB, carbamilcolina (cloruro), amantadina (hidrocloruro), quinacrina mostaza (dihidrocloruro), procaína (hidrocloruro), d-tubocurarina (cloruro), α -cobrotoxina y α -bungarotoxina fueron adquiridas en Sigma Chemical Company, St. Louis, MO., E.E.U.U.

Asolectina fue adquirida en Associated Concentrates, Woodside, NY, E.E.U.U. y en Sigma.

Affi-Gel 401 y Bio-Gel A 15-m fueron adquiridos en Bio-Rad, Richmond, Ca., E.E.U.U.

$[^{125}\text{I}]$ - α -bungarotoxina (actividad específica 16-17 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) fue adquirida en New England Nuclear, E.E.U.U. y $^{86}\text{Rb}^+$ (actividad específica 0,3-1 Ci/g; en ClH 0,5 N) fue adquirido en la Comisión Nacional de Energía Atómica (República Argentina).

RESULTADOS

IV.1. CARACTERIZACION DEL RECEPTOR NICOTINICO DEL ORGANO ELECTRICO DE *Discopyge tschudii*.

IV.1.a Estudios del receptor nicotínico en membranas nativas

El primer paso en la caracterización del receptor nicotínico del órgano eléctrico de *D. tschudii*, fue la preparación de una fracción de membranas ricas en receptor.

Luego de la centrifugación en gradientes de sacarosa del material homogeneizado de órgano eléctrico se obtuvieron 3 bandas: A (en la capa de sacarosa al 30%), B (sobre la capa de sacarosa al 35%), y C (a nivel de la capa de sacarosa al 41%).

Los resultados correspondientes a una preparación de membranas se muestran en la Tabla 1. Se observó que la banda B presenta la mayor fijación específica de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ y la menor actividad de la enzima ACE.

La concentración de sitios receptores en la fracción B varió en las distintas preparaciones entre 0,13 y 3,92 nmoles/mg proteína y la cantidad total de sitios entre 0,08 y 1,10 nmoles/g tejido fresco. Por otro lado, el porcentaje de sitios en cada fracción (A: $19,2 \pm 4,3 \%$; B: $25,8 \pm 8,8 \%$; C: $43,3 \pm 7,1 \%$; media \pm D.S. de 7 experimentos) y la cantidad total de proteína de las 3 fracciones ($1,34 \pm 0,36$ mg/g tejido fresco; media \pm D.S. de 7 experimentos) no variaron en forma apreciable entre las preparaciones.

La fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ a la fracción B de

membranas, como se muestra en la Tabla 2, fue bloqueada por incubación previa de las mismas con α -CTX no radiactiva, sugiriendo la especificidad de la unión de la α -BuTx. Los efectos de los bloqueantes no competitivos amantadina y quinacrina mostaza (QM) sobre el receptor nicotínico se discutirán más adelante.

El receptor presente en las membranas nativas exhibió influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb y dicha respuesta fue bloqueada por el antagonista nicotínico d-TC y por incubación previa con Carb (desensibilización), tal como puede verse en la Tabla 3. Como se explicó anteriormente la desensibilización es un fenómeno reversible por el cual la respuesta del receptor nicotínico se bloquea en presencia prolongada de activadores.

IV.1.b Extracción y purificación del receptor nicotínico por cromatografía de afinidad

Con el objeto de caracterizar bioquímicamente el receptor nicotínico presente en el órgano eléctrico de D. tschudii, el receptor se purificó por cromatografía de afinidad utilizando BAC como ligando unido a la columna de Affi-Gel-401, como fue descrito por Reynolds y Karlin (1978).

El receptor fue extraído de fracciones de membranas crudas y purificadas utilizando colato de sodio al 1 %. La extracción se realizó sin el agregado de lípidos exógenos. Se ha informado que el receptor extraído del órgano eléctrico de T. californica conserva sus propiedades funcionales intactas sin necesidad de agregar lípidos adicionales si se utiliza colato de sodio en una concentración de 1% (Huganir y col. 1979).

Por el contrario, todos los pasos de la purificación se realizaron en presencia de lípidos exógenos (2 mg/ml de

asolectina). Sin lípidos adicionales en las soluciones de lavado y de elución de la columna se produce una pérdida irreversible de las propiedades de flujo iónico del receptor nicotínico de I. californica (Huganir y col., 1979; Lindstrom y col., 1980; Anholt y col., 1981).

Los resultados correspondientes a un experimento de purificación del receptor nicotínico del órgano eléctrico de D. tschudii se muestran en la Tabla 4. En once experimentos se obtuvieron entre 0,7 y 7,4 mg de receptor a partir de 100 g de tejido dependiendo del tiempo transcurrido desde la preparación de la columna de afinidad hasta el momento de la purificación.

La fijación específica de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ osciló entre 3,2 y 6,2 nmoles/mg proteína, lo que constituyó un aumento de 10 a 20 veces con respecto a la cantidad fijada a las membranas nativas.

El material purificado presentó una baja actividad de ACE que correspondió a un 3 % de la actividad enzimática inicial (Tabla 4).

Con el propósito de estudiar la composición en subunidades del receptor purificado se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. La Fig. 1 muestra que el material purificado del órgano eléctrico de D. tschudii presentó 4 bandas coloreadas con azul de Coomassie de PM aparentes de 41.200, 49.500, 60.000 y 66.300.

La composición de aminoácidos de las subunidades aisladas se muestra en la Tabla 5. Se observó que los 4 polipéptidos contienen un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, siendo el promedio para las 4 subunidades de 42,5 moles %.

IV.2. RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO EN LIPOSOMAS

IV.2.a Influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ y fijación de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ al receptor nicotínico incorporado en liposomas

El receptor purificado y reconstituido en liposomas constituye un sistema adecuado para estudiar los distintos aspectos de su funcionamiento ya que las propiedades de fijación de ligandos y de permeación iónica pueden ser estudiadas en la misma preparación, constituida por una proteína única en una matriz lipídica de composición definida.

Se estudió la incorporación a liposomas de asolectina por el método de diálisis de colato, del receptor de D. tschudii extraído de las membranas nativas y posteriormente purificado por cromatografía de afinidad. La técnica de diálisis, descrita por primera vez por Epstein y Racker (1978), se utiliza comúnmente en la reconstitución del receptor nicotínico de las especies del género Torpedo.

El receptor, tanto el extraído de membranas nativas de la fracción B como el purificado por cromatografía de afinidad, incorporado a liposomas presentó influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb, lo que se muestra en la Tabla 6. Este resultado indica que el receptor conservó sus propiedades de control de la permeabilidad iónica luego del tratamiento a que fue sometido.

En los experimentos que se detallarán en secciones posteriores sobre el curso temporal del proceso de inactivación de la respuesta del receptor, y el mecanismo de acción de la amantadina y del pentapéptido Tp5 sobre el receptor, se utilizaron preparaciones de receptor reconstituido a partir de receptor purificado, manteniendo constante la relación L/F en 62,5 (p/p) y la concentración de asolectina en 15.7 mM.

El receptor purificado y reconstituido en liposomas presentó una fijación específica de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ que varió entre 2,30 y 7,88 nmoles/mg proteína, con una media \pm D.S. de $4,77 \pm 1,45$ en 22 experimentos realizados con 12 preparaciones diferentes.

El influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ medido a 10 segundos y normalizado para la misma masa de $^{86}\text{Rb}^+$ (3 μg), osciló entre 0,43 y 1,90 nmoles/nmol receptor en ausencia de Carb, y 1,70 y 4,95 nmoles/nmol receptor en presencia de Carb. La respuesta promedio \pm D.S. fue $1,74 \pm 0,79$ nmoles/ nmol receptor en 12 experimentos utilizando 7 preparaciones diferentes.

Dado que se ha observado que la congelación y descongelación produce un aumento del tamaño de vesículas conteniendo receptor nicotínico (Anholt y col., 1982), se realizaron experimentos tendientes a conocer el efecto de la congelación sobre la magnitud de la respuesta del receptor a la Carb. En tal sentido, las muestras de liposomas conteniendo receptor fueron sometidas a un ciclo de congelación y descongelación antes de medir la respuesta del receptor a Carb. El influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb y el volumen interno de las vesículas aumentaron luego de dicho tratamiento (Tabla 7). Teniendo en cuenta estos resultados, en todos los ensayos de influjo realizados en el presente trabajo, las vesículas conteniendo receptor se congelaron previamente.

IV.2.b. Detección de los estados de afinidad para Carb del receptor nicotínico reconstituido en liposomas

El efecto de los agonistas sobre la velocidad inicial de fijación de $\alpha\text{-BuTx}$ es un indicador sensible del estado funcional

del receptor nicotínico (Walker y col., 1981 a) pues permite evidenciar las transiciones de afinidad del receptor que se correlacionan con el fenómeno de desensibilización (Weber y col., 1975; Weiland y col., 1976; 1977; Quast y col., 1978; Weiland y Taylor, 1979).

Las transiciones de afinidad para agonistas del receptor reconstituido en liposomas se estudiaron mediante experimentos de competición con $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$.

En la Fig. 6 se muestra que la Carb produjo una mayor inhibición de la velocidad inicial de fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ al receptor en condiciones de preincubación que en condiciones de coincubación. Los valores de las constantes de velocidad de asociación de segundo orden (k_{τ}) se muestran en la Tabla 10 (control). Los valores de k_{τ} en presencia de Carb (coincubación) fueron significativamente diferentes de los valores correspondientes a la preincubación con dicha droga. Estos resultados indican que el receptor de *D. tschudii* purificado y reconstituido en vesículas de asolectina exhibe transiciones de afinidad inducidas por el agonista Carb.

Con el fin de evaluar en forma cuantitativa los estados de afinidad del receptor, se calcularon las constantes de baja y de alta afinidad para Carb. El receptor se expuso a Carb y $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ simultáneamente para medir la constante de baja afinidad (K_1). Para medir la constante de alta afinidad (K_2), el receptor se preincubó con Carb 10 μM durante 30 minutos para llevar el receptor al estado desensibilizado.

La velocidad inicial relativa de fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ (k/k_{max}) en función del logaritmo de la concentración de Carb, medida en un experimento puede verse en la

Fig. 2. Los valores de K_1 y K_2 calculados a partir de los gráficos mostrados fueron $6,4 \times 10^{-6}M$ y $4,7 \times 10^{-6}M$ respectivamente.

Se estudió, luego, en receptor reconstituido, el curso temporal de las transiciones de afinidad inducidas por Carb. La velocidad inicial relativa de fijación de $[^{125}I]-\alpha-BuTx$ (k/k_{max}) disminuyó a medida que aumentó el tiempo de preincubación con Carb $10 \mu M$, y el proceso de transición de afinidad inducido por Carb se completó en aproximadamente 10 minutos (Fig. 7).

IV.2.c Inactivación de la respuesta del receptor reconstituido en liposomas en presencia de agonistas (desensibilización)

La velocidad de desensibilización del receptor nicotínico se determinó preincubando el receptor con Carb y midiendo el influjo iónico luego de dicho tratamiento.

Mediante el ensayo manual de influjo de $^{86}Rb^+$ utilizado en el presente trabajo se midió la etapa lenta de inactivación del receptor, durante la cual se completa el fenómeno de desensibilización. Dicho fenómeno se inicia con una etapa rápida la cual ocurre entre 100 a 300 msec después de agregado el agonista y por lo tanto no es detectada en estos experimentos.

La velocidad de inactivación lenta aumentó con el incremento en la concentración de Carb utilizada en la preincubación (Fig. 3 y Tabla 8).

Se conoce que el Ca^{2+} aumenta la velocidad de desensibilización del receptor nicotínico. Esto fue observado mediante mediciones electrofisiológicas en preparaciones neuromusculares (Manthey, 1966; Magazanick y Vyskocil, 1970) y en experimentos de flujo de $^{22}Na^+$ en fragmentos de membranas de I.

marmorata.

Se observò, tambièn, que la velocidad de inactivaciòn de la respuesta iònica del receptor purificado y reconstituido en liposomas aumentò en forma significativa en presencia de Cl_2Ca 1 mM (Fig. 3 y Tabla 8). Estas observaciones sugieren que el fenómeno de desensibilizaciòn y su aceleraciòn por Ca^{2+} son propiedades intrínsecas del receptor.

Los resultados mostrados sugieren que el òrgano elèctrico de D. tschudii contiene un receptor colinérgico de tipo nicotínico compuesto por cuatro tipo de subunidades. Dicho receptor puede ser purificado por cromatografía de afinidad y reconstituido en liposomas de asolectina. El receptor reconstituido conserva sus propiedades de fijaciòn de ligandos y de translocaciòn de iones, y manifiesta, ademàs, cambios de afinidad para Carb y el fenómeno de desensibilizaciòn.

IV.3 EFECTO DE LA AMANTADINA SOBRE EL RECEPTOR NICOTINICO EN MEMBRANAS RECONSTITUIDAS

Los bloqueantes no competitivos inhiben la respuesta del receptor nicotínico uniéndose a un sitio diferente del sitio para acetilcolina.

La amantadina es una droga con aplicación terapéutica ya que inhibe las infecciones del virus de la influenza (Davies y col., 1964) y mejora la sintomatología de la enfermedad de Parkinson (Grelak y col., 1970). Por otro lado, la amantadina inhibe la transmisión neuromuscular reduciendo la respuesta de la membrana muscular a la acetilcolina (Nastuk y col., 1976), habiéndose demostrado que se fija al receptor en un sitio distinto del sitio de fijación para acetilcolina (Albuquerque y col., 1978).

Con el objetivo de conocer con mayor profundidad el mecanismo de acción de la amantadina sobre el receptor nicotínico, se estudió el efecto de esta droga sobre las propiedades funcionales del receptor reconstituido en liposomas.

El efecto de la preincubación de vesículas conteniendo receptor con los bloqueantes no competitivos amantadina y QM sobre la fijación de [125 I]- α -BuTx en equilibrio y sobre el influjo de 86 Rb $^{+}$ inducido por Carb se muestra en la Tabla 9. La amantadina no afectó la fijación de α -BuTx pero redujo el influjo de iones estimulado por Carb a las concentraciones estudiadas. A dichas concentraciones, 10^{-4} M y 10^{-5} M, la amantadina bloquea la transmisión neuromuscular (Nastuk y col., 1976; Albuquerque y col., 1978) e inhibe la fijación de [3 H]-perhidrohistriónicotina, pero que no afecta la fijación de [3 H]-acetilcolina a fragmentos de membranas de *T. ocellata* (Albuquerque y col., 1978).

La falta de efecto de la amantadina sobre la fijación de α -BuTx se observó en cinco experimentos más utilizando cuatro preparaciones diferentes de proteoliposomas. En uno de los experimentos, no se observó efecto con concentraciones de amantadina entre 10^{-3} M y 10^{-6} M.

En la Tabla 9 se muestra, además, que la QM tiene un efecto diferente al de la amantadina sobre el receptor nicotínico, ya que a una concentración de 10^{-4} M afectó el influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb y la fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$. En forma coincidente con estos resultados, la amantadina no modificó la fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ al receptor presente en las preparaciones de membranas nativas, mientras que la QM a una concentración de 10^{-4} M inhibió dicha fijación (Tabla 2).

La inhibición del influjo de cationes inducido por Carb fue mayor cuando las vesículas conteniendo receptor fueron expuestas a QM que cuando lo fueron a amantadina. El tiempo empírico medio de llenado de las vesículas calculado a partir del gráfico de efecto/efecto infinito en función del tiempo de ensayo (Fig. 4) fue 2,3 minutos para las vesículas control, 4,3 minutos para las vesículas preincubadas con amantadina y 13,6 minutos para las vesículas preincubadas con QM.

La mayor inhibición de la respuesta iónica del receptor por QM podría ser el resultado de un efecto aditivo, sobre la fijación de α -BuTx y sobre el influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ inducido por Carb, que la QM ejerce sobre el receptor, tal como aquí se describe y como fue observado y por Kaldany y Karlin (1983).

Se estudió, luego, el efecto de la amantadina sobre la velocidad de fijación de α -BuTx. La Fig. 5 muestra los resultados de un experimento en el cual se midió la velocidad de fijación de

$[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ en presencia de amantadina (coincubación). Se observó que la amantadina en concentraciones entre 10^{-4} M y 10^{-6} M no modificó la velocidad de fijación de toxina. Los experimentos en los cuales las membranas se preincubaron con amantadina utilizando las mismas concentraciones dieron resultados similares. Las constantes de velocidad de segundo orden (k_T) no difirieron en forma significativa en membranas control y en membranas tratadas (coincubadas y preincubadas) con amantadina ($k_T = 1,86 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$).

La observación de que la amantadina no afectó la fijación en equilibrio ni la velocidad de fijación de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$, sugirió que esta droga podría ejercer su acción en un sitio distinto del sitio de fijación de agonistas; dicho sitio podría estar localizado en el canal iónico o en otra parte de la molécula de receptor o bien en la interfase lípido-proteína.

Con el objeto de obtener evidencias sobre el sitio de acción de la amantadina, se estudió el efecto de la misma sobre las transiciones de afinidad inducidas por Carb y sobre el curso temporal del proceso de desensibilización. Como se demostró en la primera parte del presente trabajo ambas propiedades se manifiestan en el receptor nicotínico de D. tschudii reconstituido en liposomas.

El receptor reconstituido en liposomas exhibió transiciones de afinidad inducidas por Carb luego del tratamiento con amantadina (Fig. 6). Las constantes de velocidad (k_T) en los tres casos (control, coincubación y preincubación con (Tabla 10).

En un experimento se incluyó el anestésico local y bloqueante no competitivo procaína (Tabla 10). La velocidad de fijación de $\alpha\text{-BuTx}$, en presencia de procaína, fue menor tanto en

vesículas control como en las tratadas con amantadina. Además, las curvas de coincubación y preincubación con Carb fueron coincidentes (Tabla 10), lo que indica que el receptor tratado con procaína no exhibió transiciones de afinidad inducidas por Carb.

Se estudió, luego, el efecto de la amantadina sobre el curso temporal de las transiciones de afinidad inducidas por Carb. No se observaron diferencias en el curso temporal de dicho fenómeno en presencia de amantadina (Fig. 7).

Las transiciones de afinidad se correlacionan con el fenómeno de desensibilización, por lo que los resultados que se muestran en la Fig. 7 indican que la amantadina no ejercería su efecto inhibitorio promoviendo el establecimiento del estado desensibilizado del receptor.

La Fig. 3 muestra que el ensayo de influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ inducido por Carb permitió evidenciar claramente el proceso de desensibilización de la respuesta del receptor. Se estudió, entonces, el efecto de la amantadina sobre la velocidad de inactivación de la respuesta del receptor.

La Fig. 8 muestra el resultado de un experimento en el cual se midió el curso temporal de la inactivación de la respuesta inducida por Carb en presencia y en ausencia de amantadina. Se observó que el tratamiento de las membranas reconstituidas conteniendo receptor con amantadina 10^{-4} M disminuye el tiempo empírico medio de inactivación, siendo de 39 segundos para las membranas control y de 21 segundos para las membranas preincubadas con amantadina. En otros dos experimentos realizados, el tiempo empírico medio de inactivación en presencia de amantadina fue 55 % y 80 % del valor correspondiente al control.

IV.4 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO POR EL METODO DE PRECIPITACION CON POLIETILENGLICOL

Como se explicó anteriormente la reconstitución involucra la separación del receptor de la membrana mediante el empleo de un detergente y su inserción en una membrana artificial de composición definida.

Un paso importante en los procedimientos de reconstitución es la eliminación del detergente. La reducción de la concentración de detergente por debajo de la concentración micelar crítica, permite la agregación de los lípidos y de la proteína en forma de bicapas lipídicas cerradas (vesículas) con la proteína incorporada a las mismas. Sólo una adecuada eliminación del detergente permite que la reconstitución resulte exitosa.

Varios métodos han sido utilizados para la eliminación del detergente en la reconstitución de la función del receptor nicotínico: diálisis (Epstein y Racker, 1978), dilución (Huganir y col., 1979) y filtración en geles (Huganir y Racker, 1982).

En la reconstitución de otros sistemas receptores se ha utilizado una técnica consistente en precipitar con PEG el receptor previamente extraído de la membrana e insertarlo posteriormente en liposomas (Kremenetzky y Atlas, 1984; Aguilar y Ochoa, 1986). Este método de reconstitución tiene la ventaja, sobre el método de diálisis, de permitir una eliminación más rápida del detergente.

Se estudió, entonces, la aplicación del método de precipitación con PEG para reconstituir la función del receptor nicotínico del órgano eléctrico de D. tschudii.

Se analizó en primer lugar la incorporación del receptor a los liposomas, ya que la misma constituye un requisito

indispensable para que el sistema reconstituido sea funcional.

Con tal fin se utilizó una columna de Bio-Gel-A-15 m. Las muestras se incubaron con $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ y se filtraron a través de la columna. La Fig. 9 muestra los perfiles de elución de la columna de muestras reconstituidas por los métodos de diálisis de colato y de precipitación con PEG. Se observó que los sitios que fijan $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ eluyen junto con los lípidos (Fig. 9 A-B, C-D) en ambos tipos de preparaciones. La elución conjunta de los sitios que fijan $\alpha\text{-BuTx}$ y los lípidos constituye un buen criterio de incorporación del receptor a los liposomas, ya que las vesículas preparadas por el método de diálisis de colato sometidas a congelación y fractura y observadas al microscopio electrónico muestran imágenes del receptor incluido en la membrana (Lindstrom y col., 1980; Popot y col., 1981; Anholt y col., 1982). Además dichas vesículas exhiben patrones de migración en gradientes continuos de sacarosa compatibles con la incorporación del receptor a las mismas (Ochoa y col., 1983).

Otro requisito que se debe cumplir cuando se reconstituye un sistema de transporte de membrana es que las moléculas de proteína se orienten correctamente en la bicapa lipídica. En el caso del receptor nicotínico la orientación correcta es aquella en la cual los sitios de fijación de acetilcolina quedan expuestos hacia el exterior de las vesículas.

Para determinar el porcentaje de sitios expuestos, se incubaron 100 pmoles de sitios con 200-250 pmoles de $\alpha\text{-CTX}$ no radiactiva en TIB/BSA o con un volumen equivalente de TIB/BSA a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego las vesículas se diluyeron con solución NMT₁₀₀ y se realizó un ensayo de fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ en la forma habitual. El porcentaje de sitios

expuestos se calculó de la siguiente manera:

$$\left(1 - \frac{\text{sitios en presencia de } \alpha\text{-CTX}}{\text{sitios en ausencia de } \alpha\text{-CTX}} \right) \times 100$$

Se calculó que 89 % de los sitios que fijan $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ se orientan hacia el exterior de las vesículas preparadas por precipitación con PEG (sitios totales: $4,08 \pm 0,13$ pmoles; sitios internos: $0,43 \pm 0,03$ pmoles; media \pm D.S de tres determinaciones). En las vesículas preparadas por el método de diálisis de colato el porcentaje de sitios expuestos fue 82 % (sitios totales: $4,26 \pm 0,22$ pmoles; sitios internos $0,76 \pm 0,05$; media \pm D.S de tres determinaciones). Estos resultados indican que un alto porcentaje de las moléculas de receptor se orientaron correctamente en la membrana mediante la técnica de precipitación con PEG y que dicho porcentaje es comparable al que se obtiene por el método de diálisis.

Con el objeto de determinar si se produce una pérdida de sitios durante la reconstitución del receptor por precipitación con PEG, se midió la fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ en las distintas etapas del procedimiento. Una pérdida promedio del 54 % de los sitios que fijan $\alpha\text{-BuTx}$ se observó al utilizar este procedimiento (Tabla 11).

Una vez comprobadas la incorporación y la correcta orientación del receptor reconstituido en vesículas por precipitación con PEG, se estudiaron sus propiedades funcionales. Se realizaron estudios de las transiciones de afinidad e influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb.

Los experimentos donde se midió la velocidad de fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$, además de permitir evaluar las transiciones de

afinidad del receptor, brindan evidencias sobre la correcta orientaci3n del receptor en la membrana, debido a que este ensayo se realiza en un medio sin detergente y la toxina, cuyo peso molecular es de aproximadamente 8.000, no puede penetrar en las vesiculas. El valor de la constante de velocidad de segundo orden (k_T) fue similar para el receptor reconstituido por los m3todos de precipitaci3n con PEG y de di3lisis (Tabla 12).

Se estudi3 luego la capacidad del receptor reconstituido por el m3todo de precipitaci3n con PEG de translocar iones. A diferencia de las vesiculas preparadas por di3lisis, el receptor nicotnico presente en las muestras reconstituidas por precipitaci3n con PEG no exhibi3 influjo de $^{86}Rb^+$ estimulado por Carb, como se muestra en la Tabla 12. En las vesiculas preparadas por el m3todo de di3lisis la respuesta del receptor a Carb correspondi3 a un 53 ± 17 % (media \pm D.S. de 25 experimentos) del influjo total (en presencia de Carb); en las vesiculas preparadas por precipitaci3n con PEG dicho porcentaje correspondi3 a s3lo el $7,8 \pm 5,8$ % (media \pm D.S. de 6 experimentos).

M3s a3n, las transiciones de afinidad, cuya manifestaci3n es una condici3n necesaria pero no suficiente para el funcionamiento del receptor (Ochoa y col., 1983), tampoco se hicieron evidentes en las muestras reconstituidas por el m3todo de precipitaci3n con PEG (Tabla 12). Se observ3 que los valores de la k_T bajo condiciones de coincubaci3n y preincubaci3n con Carb resultaron similares.

El valor de la constante de baja afinidad por Carb (K_1) no se modific3 por el tratamiento con PEG (Tabla 12), indicando que la ausencia de transiciones de afinidad y de influjo de $^{86}Rb^+$ no se deberia al establecimiento de un estado desensibilizado del

receptor.

Los resultados de los experimentos de filtración en geles y de orientación del receptor en la membrana indicaron que la ausencia de respuesta del receptor reconstituido por PEG no puede explicarse por la falta de incorporación del mismo a la membrana o por un bajo porcentaje de sitios expuestos al agonista.

Se consideró, entonces, la posibilidad de que la exposición del receptor a 37 °C fuera la causa de la inactivación de la respuesta. Los resultados indican que esto no es así. Se observó que las membranas reconstituidas por diálisis y sometidas a 37 °C durante dos períodos de 1,5 minutos, presentaron influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb (Carb +: $5,36 \pm 0,84$ nmoles $^{86}\text{Rb}^+$ /nmol receptor; Carb -: $2,89 \pm 0,14$ nmoles $^{86}\text{Rb}^+$ /nmol receptor; media \pm D.S de tres determinaciones; efecto: $2,47$ nmoles $^{86}\text{Rb}^+$ /nmol receptor).

Se ha informado la presencia de impurezas en las preparaciones comerciales de PEG (Hamburger y col., 1975; Honda y col., 1981) tales como sustancias que inician y terminan la polimerización del óxido de etileno, productos oligoméricos de PEG, productos de descomposición oxidativa del PEG tales como aldehídos o ácidos, y antioxidantes. Estas impurezas presentes en las preparaciones de PEG podrían ser las responsables de los efectos mencionados en las preparaciones reconstituidas.

Para estudiar la posibilidad de que las impurezas presentes en las preparaciones de PEG interfirieran con el correcto funcionamiento del receptor, se purificó una muestra de PEG mediante extracción con éter etílico como fue descrito por Honda y col. (1981), y se utilizó la preparación purificada para la reconstitución.

Se observò que el receptor incorporado a vesículas preparadas utilizando PEG purificado exhibió transiciones de afinidad (Tabla 12) e influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb (Tabla 14). Cuando las impurezas se agregaron a la preparación de PEG purificado, la respuesta en las membranas reconstituidas fue menor (Tabla 14).

Se intentò establecer las posibles causas de la falta de influjo iónico estimulado por Carb en las preparaciones reconstituidas por el método de precipitación con PEG.

Se estudiò el efecto del PEG 25 % (concentración a la cual se expone el receptor durante el procedimiento de reconstitución) sobre la fijación en equilibrio de $[\text{}^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ y sobre la actividad de la enzima ACE. El PEG no afectò la fijación de toxina a proteoliposomas preparados por la técnica de diálisis, ni la actividad de la enzima ACE de membranas nativas de órgano eléctrico (Tabla 15).

Estas observaciones, sumadas al hecho de que el PEG a la concentración utilizada en el presente trabajo no interactúa con proteínas tales como la albúmina de suero bovino y la ribonucleasa (Atha e Ingham, 1981), sugieren que la molécula de receptor conserva su integridad luego del procedimiento de reconstitución.

Se realizaron en el laboratorio experimentos tendientes a conocer si el PEG o las impurezas presentes en las muestras de PEG perturbaban las moléculas de los lípidos adyacentes al receptor, los cuales son mencionados aquí para facilitar la posterior discusión de los resultados. El estudio del contenido de lípidos polares y neutros en un extracto total de lípidos de vesículas preparadas por los métodos de diálisis y de precipitación con PEG

(purificado y no purificado) por cromatografía en capa delgada y densitometría cuantitativa revelò que las vesículas preparadas con PEG no purificado mostraron una mancha más densa a la altura de la relación de frentes (R_f) correspondiente a los ácidos grasos libres comparadas con las muestras preparadas por diálisis. No se observaron diferencias a nivel de los lípidos polares. El aumento porcentual promedio de los ácidos grasos libres respecto del resto de los lípidos, ésteres de esteroles, triglicéridos, esteroides y lípidos polares, fue de $62,51 \pm 8,61$. Estos resultados indicaron que las preparaciones de vesículas reconstituidas por el método de precipitación con PEG fueron más ricas en ácidos grasos libres que las muestras preparadas por diálisis de colato.

IV.5 ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DE LA TIMOPENTINA (TP5) SOBRE EL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIPOSOMAS

Con el objeto de profundizar en el conocimiento del funcionamiento del receptor, y más específicamente de los factores que modifican la desensibilización, se estudió el efecto del pentapéptido timopentina sobre algunas propiedades funcionales del receptor. Este péptido posee una estructura primaria que corresponde a los aminoácidos 32 a 36 de la timopoyetina y corresponde al sitio activo de la hormona.

Tanto la hormona entera como el pentapéptido derivado de ella, además de sus efectos inmunológicos, producen un bloqueo de la transmisión neuromuscular.

En primer lugar se estudió el efecto de la Tp5 sobre la fijación en equilibrio de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ al receptor incorporado a liposomas. A diferencia de la $\alpha\text{-BuTx}$ no radiactiva, la Tp5 no inhibió la fijación de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ a concentraciones de 10^{-6}M y 10^{-4}M (Tabla 16). Más aún, en un experimento se observó que la Tp5 a una concentración de 10^{-4}M no modificó la velocidad de fijación de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ ni las transiciones de afinidad inducidas por Carb.

Si bien la Tp5 no afectó la fijación en equilibrio ni la velocidad de fijación de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$, el pentapéptido modificó el flujo iónico inducido por Carb en un amplio rango de concentraciones (Tabla 17).

Aunque la Tp5 redujo el influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ a las vesículas en presencia y en ausencia de Carb, el efecto inhibitorio de la Tp5 que se muestra en la Tabla 17, fue producido a expensas del influjo inducido por Carb. En 5 experimentos realizados con Tp5 10^{-4}M el porcentaje de reducción de los valores de influjo en

presencia y en ausencia de Carb fueron 55% y 36% respectivamente.

El efecto inhibitorio de la Tp5 sobre la función del receptor reconstituido en liposomas podría deberse a una inducción por parte de péptido del estado desensibilizado del receptor en el cual el canal se encuentra cerrado y el receptor no es activable por el agonista. Esta hipótesis cobró fuerza al publicarse, mientras este estudio se estaba llevando a cabo, un trabajo de Revah y col. (1987), quienes estudiaron el efecto de la Tpo sobre el receptor mediante técnicas de "patch clamp" en miotubos de la línea celular C₂ del ratón y por ensayos bioquímicos en fragmentos de membranas ricos en receptor purificados del órgano eléctrico de T. marmorata. Estos autores demostraron que la Tpo acelera la velocidad de desensibilización del receptor en presencia de Ca²⁺.

Teniendo en cuenta estas evidencias, se estudió el efecto de la Tp5 sobre la velocidad de la etapa lenta de inactivación del receptor reconstituido en liposomas. Las muestras de proteoliposomas se preincubaron con Tp5 a concentraciones entre 10⁻¹⁰M y 10⁻³M. Se observó que la Tp5 acorta el tiempo empírico medio de inactivación únicamente a una concentración de 10⁻³M (Fig. 10). Los valores de tiempo empírico medio fueron 48,4 segundos para las membranas control y 22,8 segundos para las membranas preincubadas con Tp5.

Cuando los liposomas se prepararon en un medio conteniendo Cl₂Ca 1mM y la concentración de Tp5 fue 10⁻⁴M, la reducción del tiempo empírico medio de inactivación fue más acentuada aún (Fig. 10): 24,6 segundos para las vesículas control y 9,3 segundos para las vesículas tratadas con Tp5.

TABLA 1.

FIJACION DE [125 I]- α -BuTx, ACTIVIDAD DE ACE Y CONTENIDO DE
PROTEINAS EN MEMBRANAS NATIVAS DE D. tschudii

Fracción	[125 I]- α -BuTx fijada (nmoles/mg)	ACE (μ moles ATC/mg.min)	Proteína (mg)
A	0,63	18.7	69
B	1,65	9.0	64
C	1,06	24.9	100

Los resultados pertenecen a un experimento partiendo de 179 g de tejido. Los valores corresponden a la media de 2 determinaciones. Se realizaron un total de siete experimentos en los cuales la cantidad de tejido original varió entre 50 y 290 g. En todos los casos la fracción B presentó la mayor fijación específica de [125 I]- α -BuTx.

TABLA 2

FIJACION DE [125 I]- α -BuTx A MEMBRANAS NATIVAS DE D. tschudii EN
PRESENCIA DE LIGANDOS NICOTINICOS

Muestra	[125 I]- α -BuTx fijada (pmoles / mg)
Control	130
α -CTX 4×10^{-7} M	21 (84)
α -CTX 4×10^{-6} M	2 (98)
Amantadina 10^{-8} M	135 (0)
Amantadina 10^{-6} M	133 (0)
QM 10^{-8} M	144 (0)
QM 10^{-6} M	49 (62)

Membranas nativas de la fracción B (proteína: 0,04 μ g/ml) fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente con las drogas especificadas y luego se llevó a cabo un ensayo de fijación de [125 I]- α -BuTx en equilibrio como se explicó en Materiales y Métodos. Los valores corresponden a la media de determinaciones realizadas por duplicado. Entre paréntesis se expresa el porcentaje de inhibición respecto del control.

TABLA 3

INFLUJO DE $^{86}\text{Rb}^+$ A MEMBRANAS NATIVAS DEL ORGANISMO ELECTRICO DE
Discopyge tschudii

Muestra	Influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ (pmoles)		
	Carb ⁺	Carb ⁻	Efecto
Control	50,7 ± 1,2	26,2 ± 1,5	24,5
Preincubación			
Carb 1,20 × 10 ⁻³ M	29,1 ± 6,6	28,7 ± 0,1	0,4
Preincubación			
d-TC 6,25 × 10 ⁻⁵ M	23,4 ± 8,4	16,0 ± 1,5	7,4

Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 0°C con Carb o d-TC a las concentraciones especificadas o con Buffer A (control). El influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ se midió como fue explicado en Materiales y Métodos utilizando 0,15 mg proteína y 5,4 µg $^{86}\text{Rb}^+$. Los ensayos se realizaron a 30 segundos. Los resultados corresponden a un experimento y se expresan como la media ± D.S de tres determinaciones.

TABLA 4

EXTRACCION Y PURIFICACION DEL RECEPTOR NICOTINICO DE D. tschudii

Etapa de la purificación	[¹²⁵ I]-α-BuTx fijada			Proteína		ACE	
	nmoles	%	nmoles/mg	mg	%	nmoles	%
Membranas	101	100	0,30	336	100	10,0	100
Extracto colato de sodio al 1%	57	56	0,25	228	68	4,6	46
Receptor purificado	10	10	4,20	2,3	0,7	0,3	3

Los resultados corresponden a un experimento a partir de 298 g de tejido, de un total de 11 experimentos realizados. La Carb utilizada para eluir el receptor de la columna se eliminó de la muestras por diálisis antes de realizar los ensayos de fijación de [¹²⁵I]-α-BuTx y de actividad de ACE. Toda la actividad de colinesterasa de D. tschudii es de tipo específico (e.g. EC: 3.1.1.7) (Ochoa, 1980 b). La actividad se expresa en nmoles de sitios catalíticos, asumiendo un PM de 80.000 por sitio catalítico y 10 moles de ATC hidrolizados por minuto y por gramo de enzima (McNamee y col., 1975).

TABLA 5
 COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE LAS SUBUNIDADES DE RECEPTOR
 NICOTINICO DE D. tschudii

Aminoácido	Moles %			
	α	β	γ	δ
Asx	10,6	11,4	12,5	13,6
Thr	6,7	6,5	6,0	5,4
Ser	7,9	7,6	5,3	5,6
Glx	11,0	11,5	11,4	9,8
Pro	5,3	6,4	6,9	6,5
Gly	6,0	4,6	5,3	5,2
Ala	4,4	5,2	5,1	5,1
Cys	0,9	0,9	1,2	1,0
Val	7,4	7,1	6,0	6,6
Met	2,8	1,5	1,6	2,0
Ile	7,8	5,9	7,0	7,3
Leu	8,0	9,8	10,6	10,0
Tyr	3,4	3,7	3,8	4,1
Phe	4,0	4,3	4,7	5,1
Trp	1,4	1,4	1,3	1,4
Lys	6,8	7,1	6,5	5,3
His	3,2	2,2	1,8	2,5
Arg	3,5	4,4	4,7	5,0

Los resultados corresponden a los valores promedio de cinco determinaciones.

TABLA 6
 RECONSTITUCION DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR NICOTINICO EN
 LIFOSOMAS

Fuente de material	Influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ (cpm $\times 10^{-3}$)		
	Carb +	Carb -	Efecto
Receptor extraido de membranas (fracci3n B)	8,80 \pm 0,70	2,34 \pm 0,19	6,46
Receptor purificado	6,95 \pm 0,57	5,13 \pm 0,79	1,82

Los resultados corresponden a la media \pm D.S de determinaciones realizadas por triplicado. Los ensayos se realizaron a 30 segundos. La relaci3n l3pido/prote3na (L/P) fue 30 para el material extraido de la fracci3n B de membranas y 150 para el material purificado. La concentraci3n de l3pido fue 33 mM en ambos casos.

TABLA 7

EFECTO DE LA CONGELACION Y DESCONGELACION SOBRE EL INFLUJO DE $^{86}\text{Rb}^+$ ESTIMULADO POR CARB Y EN EL VOLUMEN INTERNO DE LAS MEMBRANAS RECONSTITUIDAS CONTENIENDO RECEPTOR NICOTINICO

Vesiculas	Influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ (cpm $\times 10^{-3}$)			Efecto	Volumen interno (nl/ μmol lípido)
	Carb ⁺	Carb ⁻			
No congeladas	6,9 \pm 1,6	5,0 \pm 0,1		1,9	634 \pm 36
Congeladas	21,0 \pm 0,8	12,9 \pm 0,5		8,1	894 \pm 1

El influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb y el volumen interno de las vesiculas se midiò como se explicò en Materiales y Métodos en membranas no congeladas y en membranas congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongeladas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los resultados corresponden a la media \pm D.S de tres determinaciones. El influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ se midiò a 30 segundos.

TABLA 8

INACTIVACION DE LA RESPUESTA DEL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO
EN LIPOSOMAS

Preincubación	Tiempo empirico medio de inactivación (seg)
Carb 5 μ M	50,2 \pm 13,1 (n=7)
Carb 10 μ M	25,5 \pm 11,4 (n=4)*
Carb 5 μ M + Cl ₂ Ca 1 mM	23,2 \pm 3,3 (n=3)**

Los valores del tiempo empirico medio de inactivación se calcularon a partir de graficar el logaritmo de la respuesta en función del tiempo de preincubación con Carb y corresponden al tiempo al cual la respuesta se redujo a la mitad del valor inicial. Los resultados se expresan como la media \pm D.S de experimentos cuyo número se indica entre paréntesis. La significación de las diferencias entre los promedios se determinó por el test "t" de Student.

* 0,01 < p < 0,02 y ** 0,001 < p < 0,01 con respecto al valor en presencia de Carb 5 μ M.

TABLA 9

LOS EFECTOS DE PREINCUBAR VESICULAS CONTENIENDO RECEPTOR
NICOTINICO CON AMANTADINA Y QM SOBRE LA FIJACION DE $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$
Y EN EL INFLUJO DE $^{86}\text{Rb}^+$ ESTIMULADO POR CARB

Incubaciones	$\alpha\text{-BuTx}$ unida	Influjo de $^{86}\text{Rb}^+$		
		Carb ⁺	Carb ⁻	Efecto
Control	6,50±0,89	8,72±2,85	3,99±0,58	4,73
Amantadina				
10 ⁻⁸ M	6,45±0,99 (0,8)	5,35±0,43 (39)	3,24±0,38 (19)	2,11 (55)
Amantadina				
10 ⁻⁴ M	6,36±1,18 (2)	5,16±1,53 (41)	3,73±0,60 (6)	1,43 (70)
Control	6,27±0,43	5,17±0,19	1,25±0,07	3,92
QM 10 ⁻⁸ M	6,35±0,38 (0)	4,36±0,41 (16)	1,36±0,03 (0)	3,00 (23)
QM 10 ⁻⁴ M	3,38±0,01 (46)	1,69±0,13 (67)	1,29±0,05 (0)	0,40 (90)

Las membranas se incubaron con amantadina o QM a las concentraciones especificadas a 0 °C durante 20 minutos. La fijación de toxina se expresa en nmoles $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ unidos/mg proteina y el influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ en nmoles/nmol receptor. Los ensayos de influjo se hicieron a 30 segundos. Entre parentesis se indican los porcentajes de inhibición respecto de los valores control. Los resultados corresponden a la media ± D.S. de tres determinaciones.

TABLA 10

EL EFECTO DE LA AMANTADINA Y LA PROCAINA SOBRE LAS TRANSICIONES
DE AFINIDAD INDUCIDAS POR CARB

Tratamiento	k_T ($M^{-1} \text{ seg}^{-1}$) $\times 10^6$	
CONTROL		
Control	2,10 \pm 0,13 (n=4)	
Coincubaci3n	1,28 \pm 0,31 (n=4)	
Preincubaci3n	0,68 \pm 0,35 (n=4)	
AMANTADINA 10^{-4} M		
Control	2,14 \pm 0,30 (n=4)	
Coincubaci3n	1,28 \pm 0,27 (n=4)	
Preincubaci3n	0,96 \pm 0,36 (n=4)	
PROCAINA 10^{-4} M		
Control	1,70	(n=1)
Coincubaci3n	0,91	(n=1)
Preincubaci3n	1,03	(n=1)

Las constantes de velocidad de segundo orden (k_T) se calcularon a partir de experimentos similares al que se muestra en la Fig. 6, en los cuales se midi3n la velocidad de fijaci3n de $[^{125}I]-\alpha\text{-BuTx}$ a 0,5, 1, 1,5 y 2 minutos para minimizar los efectos de la desensibilizaci3n. Los valores corresponden la media \pm D.S. de n experimentos. La significaci3n de las diferencias entre los promedios de las k_T para coincubaci3n y preincubaci3n se determin3n por el test "t" de Student. $0,05 < p < 0,02$ y $0,2 < p < 0,3$ para el control y para amantadina $10^{-4}M$ respectivamente.

TARLA 11

FIJACION DE [125 I]- α -BuTx EN LAS DISTINTAS ETAPAS DE LA
RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO POR EL METODO DE
PRECIPITACION CON PEG

Etapa de la reconstitución	[125 I]- α -BuTx fijada (nmoles totales)
Receptor purificado	3,27 \pm 0,21
Receptor + asolectina + colato 2%	3,87 \pm 0,19
Receptor + asolectina + colato 2% + PEG	2,74 \pm 0,08
1 $^{\circ}$ centrifugación (80.000 x g, 60 min.)	Sobrenadante 1,06 \pm 0,04
	Sedimento 1,73 \pm 0,12
2 $^{\circ}$ centrifugación (100.000 x g, 30 min.)	Sobrenadante 0,01 \pm 0,01
	Sedimento 2,01 \pm 0,78

Los resultados corresponden a un experimento de un total de 5 realizados. Los valores indican los nmoles de sitios totales en cada fracción y se expresan como la media \pm D.S. de 3 determinaciones. El porcentaje de sitios recuperados fue 61 %, 34 %, 71 %, 52 %, y 53 % en las preparaciones realizadas.

TABLA 12

PROPIEDADES DE FIJACION DE LIGANDOS DEL RECEPTOR NICOTINICO
 RECONSTITUIDO POR DIALISIS DE COLATO Y POR PRECIPITACION CON PEG

Vesiculas	Constantes de disociación k_T ($M^{-1} \times \text{seg}^{-1}$) $\times 10^6$ para Carb (M)				
	K_1	K_2	$k_{T \text{ max}}$	$k_{T \text{ co}}$	$k_{T \text{ pre}}$
Dialisis	$2,58 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-6}$	$1,40 \pm 0,41$	$1,02 \pm 0,35$	$0,48 \pm 0,33$ (n=3)
PEG	$2,80 \times 10^{-6} \pm$ $3,7 \times 10^{-6}$	n.d*	$1,48 \pm 0,45$	$0,53 \pm 0,33$	$0,73 \pm 0,30$ (n=6)
PEG purificado	n.d.	n.d.	1,78	0,55	0,1 (n=1)

Entre paréntesis se expresa el número de experimentos realizados por duplicado.
 n.d.= no determinado; n.d*.= no determinado debido a que los valores de $k_{T \text{ co}}$ y $k_{T \text{ pre}}$ fueron similares.

TABLA 13

FLUJO IONICO DE VESICULAS CONTENIENDO RECEPTOR NICOTINICO
 PREPARADAS POR LOS METODOS DE DIALISIS DE COLATO Y DE
 PRECIPITACION CON PEG

Vesiculas	Influjo (nmoles $^{86}\text{Rb}^+$ /nmol receptor)			Vol. equilibrio (nl/ μmol lipido)
	Carb ⁺	Carb ⁻	Efecto	
Diálisis	4,36 \pm 0,46	1,39 \pm 0,15	2,97	0,76 \pm 0,11
PEG	10,49 \pm 1,40	10,09 \pm 1,10	0,40	2,84 \pm 0,12

Los resultados se expresan como la media \pm D.S de 3 determinaciones. El porcentaje promedio de la respuesta ($\text{cpm}(\text{carb}^+) - \text{cpm}(\text{carb}^-)$) respecto del influjo total ($\text{cpm}(\text{carb}^+)$) fue $7,8 \pm 5,8$ (n=6) y 53 ± 17 (n=25) para vesiculas reconstituidas por los métodos de precipitación con PEG y de diálisis de colato respectivamente

TABLA 14

INFLUJO DE $^{86}\text{Rb}^+$ A MEMBRANAS RECONSTITUIDAS POR EL METODO DE
PRECIPITACION POR PEG UTILIZANDO PEG PURIFICADO

Vesiculas	Influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ (nmoles/nmol receptor)		
	Carb ⁺	Carb ⁻	Efecto
PEG purificado	8,95 ± 1,22	6,49 ± 0,22	2,46 (27)
PEG purificado+impurezas	8,91 ± 0,68	7,84 ± 1,25	1,07 (12)

Los ensayos se realizaron a 30 segundos. Los resultados se expresan como la media ± D.S. de 3 determinaciones. Los valores indicados entre paréntesis se calcularon como fue explicado en la Tabla 13.

TABLA 15

EFECTO DEL PEG SOBRE LA FIJACION DE $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ A MEMBRANAS RECONSTITUIDAS Y SOBRE LA ACTIVIDAD ACE EN MEMBRANAS NATIVAS

Muestra	$[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ fijada (nmoles/mg)	ACE ($\mu\text{moles/min.mg}$)
Control	2,61 \pm 0,21	1,49 \pm 0,15
PEG 25 %	2,20 \pm 0,09 (84)	1,54 \pm 0,14
PEG 2,5 %	2,67 \pm 0,21 (102)	n.d.

La fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ se midió en membranas reconstituidas por el método de diálisis. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 0 °C con PEG (concentración final 25 % y 2,5 % respectivamente) o con un volumen equivalente de solución A. Luego se midió la fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ en equilibrio en la forma habitual.

La actividad de ACE se midió en membranas nativas incubadas previamente con PEG al 50 % (concentración final 25 %) durante 15 minutos a 0 °C.

Los resultados se expresan como la media \pm D.S. de 3 determinaciones. Entre paréntesis se expresan los porcentajes respecto del control. n.d.= no determinado.

TABLA 16

EL EFECTO DE LA TIMOPENTINA SOBRE LA FIJACION EN EQUILIBRIO DE
 $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ AL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIPOSOMAS

	$[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ fijada (nmoles/mg prot.)
EXPERIMENTO A	
Control	6,42 ± 0,80
Tp5 10 ⁻⁶ M	7,18 ± 0,87 (0)
$\alpha\text{-BuTx}$ 4 x 10 ⁻⁶ M	0,33 ± 0,07 (95)
EXPERIMENTO B	
Control	5,42 ± 0,17
Tp5 10 ⁻⁶ M	4,54 ± 0,19 (16)
Tp5 10 ⁻⁴ M	4,62 ± 0,48 (15)

En el experimento A, las membranas se preincubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con Tp5 o con $\alpha\text{-BuTx}$ no radiactiva a las concentraciones especificadas. Luego se midió la fijación de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$ en equilibrio, manteniendo constantes las concentraciones de uno y otro polipeptido durante todo el ensayo. En el experimento B las membranas se coincubaron con Tp5 y $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$. El control se refiere a membranas no tratadas con Tp5 o $\alpha\text{-BuTx}$ no radiactiva. Los resultados corresponden al promedio ± D.S. de tres determinaciones. Entre paréntesis se indican los porcentajes de inhibición respecto del control. El experimento A se repitió 2 veces en 2 preparaciones diferentes de membranas obteniéndose resultados similares. El experimento B se repitió 2 veces en la misma preparación no observándose inhibición de la fijación de toxina por Tp5.

TABLA 17

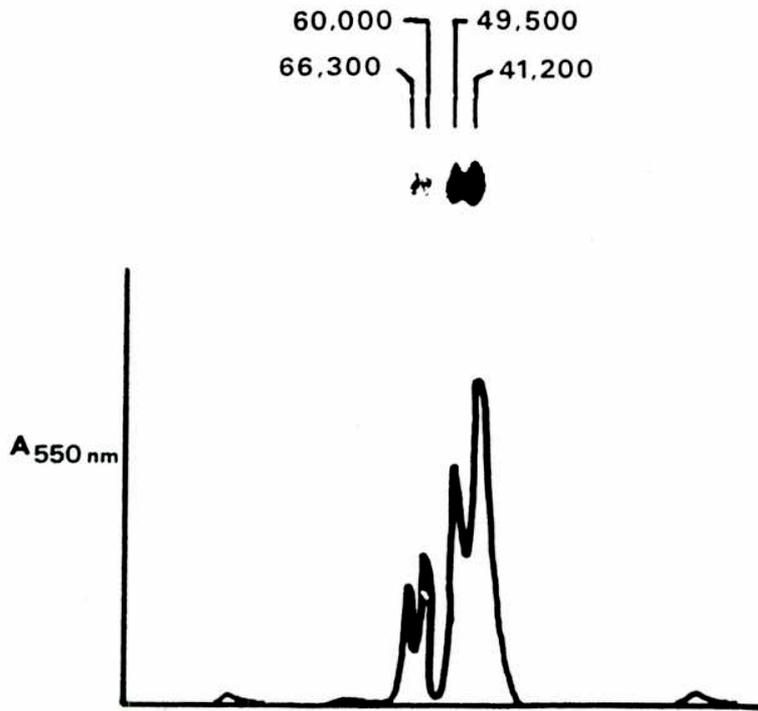
EL EFECTO DE LA TIMOPENTINA SOBRE EL INFLUJO DE $^{86}\text{Rb}^+$ INDUCIDO POR
CARB A VESICULAS CONTENIENDO RECEPTOR NICOTINICO

Incubaciones	Respuesta (nmoles $^{86}\text{Rb}^+$ /nmol receptor)
Control	3,83 ± 1,82
Tp5 10 ⁻¹⁰ M	1,08 ± 0,34 (72)
Tp5 10 ⁻⁹ M	0,87 ± 0,35 (77)
Tp5 10 ⁻⁸ M	0,27 ± 0,20 (93)
Tp5 10 ⁻⁷ M	0,55 ± 0,24 (86)

Tp5 fue incluido en la mezcla de reacción a las concentraciones finales especificadas. El influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ se midió a 30 segundos y las determinaciones se hicieron por triplicado. Los resultados corresponden al promedio ± D.S. de la diferencia. Entre paréntesis se indican los porcentajes de inhibición respecto del control. Los resultados de Tp5 10⁻⁷M fueron obtenidos en 9 experimentos utilizando 3 preparaciones diferentes de vesículas y los resultados correspondientes a Tp5 10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M y 10⁻⁸M fueron obtenidos en 2 experimentos utilizando 2 preparaciones diferentes. Resultados similares se obtuvieron en 3 experimentos en los cuales las vesículas conteniendo receptor se preincubaron con Tp5 durante 1 hora a temperatura ambiente.

FIGURA 1

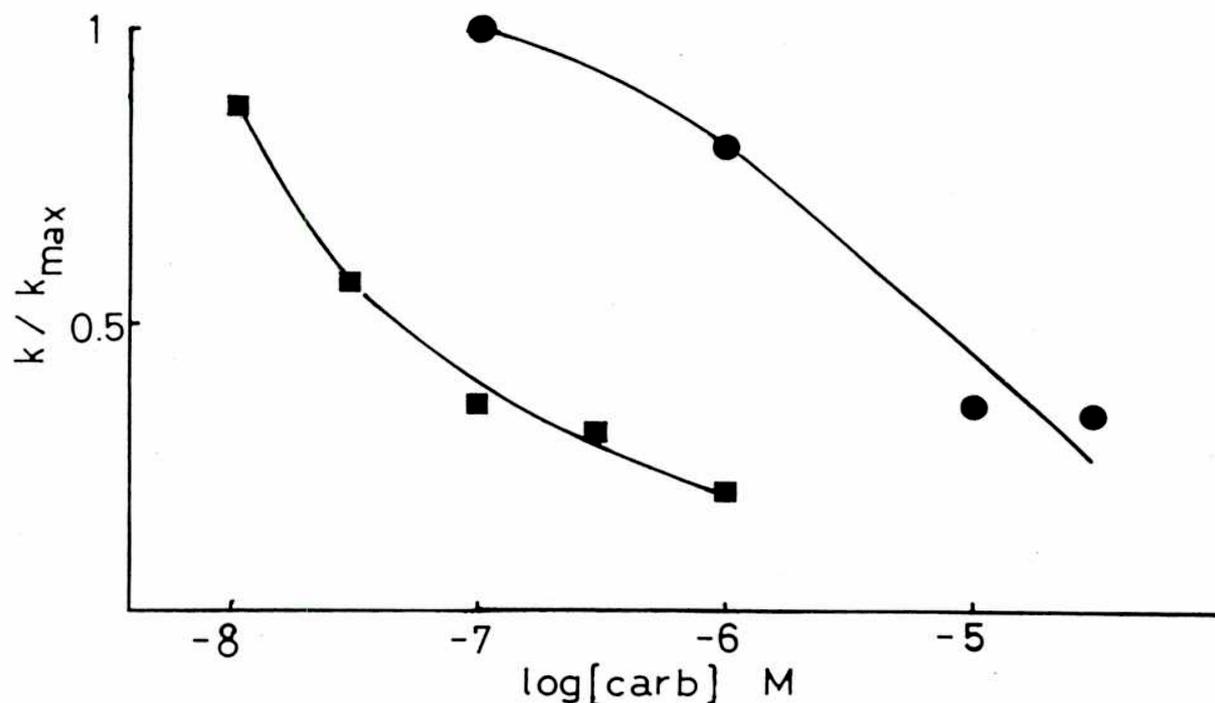
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS DEL
RECEPTOR NICOTINICO DE D. tschudii PURIFICADO POR CROMATOGRAFIA DE
AFINIDAD



El experimento se realizó como se explicó en Materiales y Métodos.
Se muestra el resultado de una corrida electroforética y el
trazado densitométrico (absorbancia a 550 nm) del gel.

FIGURA 2

INHIBICION DE LA VELOCIDAD INICIAL RELATIVA DE FIJACION DE
 $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ AL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIFOSOMAS POR
 CARB

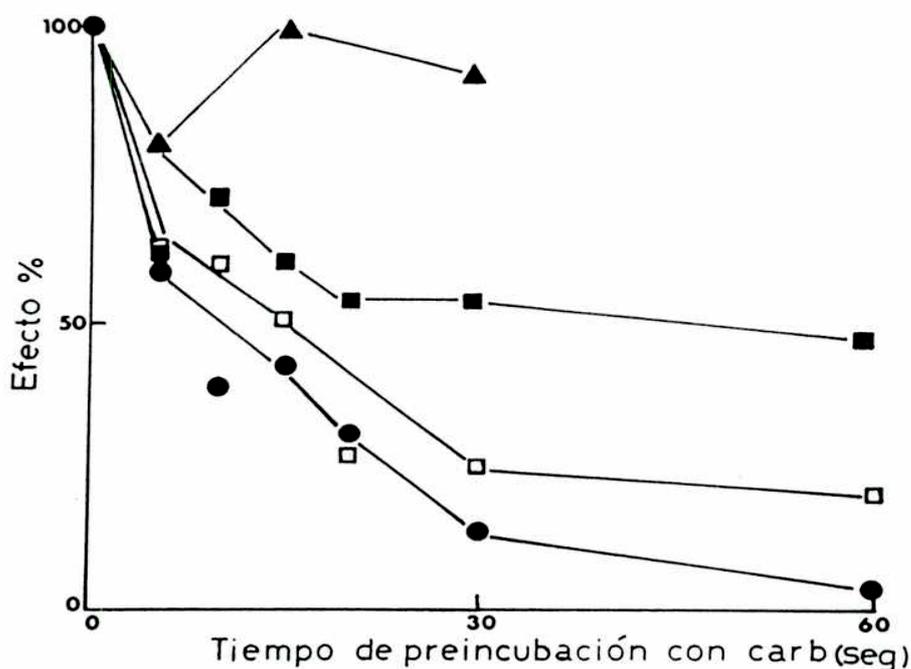


() Estado de baja afinidad (membranas no preincubadas con Carb).
 () Estado de alta afinidad (membranas preincubadas con Carb 10 μM).

La concentración final de sitios y de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ fue 5 nM y 30 nM respectivamente. La velocidad de fijación de toxina se midió a 2 minutos para minimizar los efectos de la desensibilización o de la recuperación de la misma. Los valores representan la media de dos determinaciones.

FIGURA 3

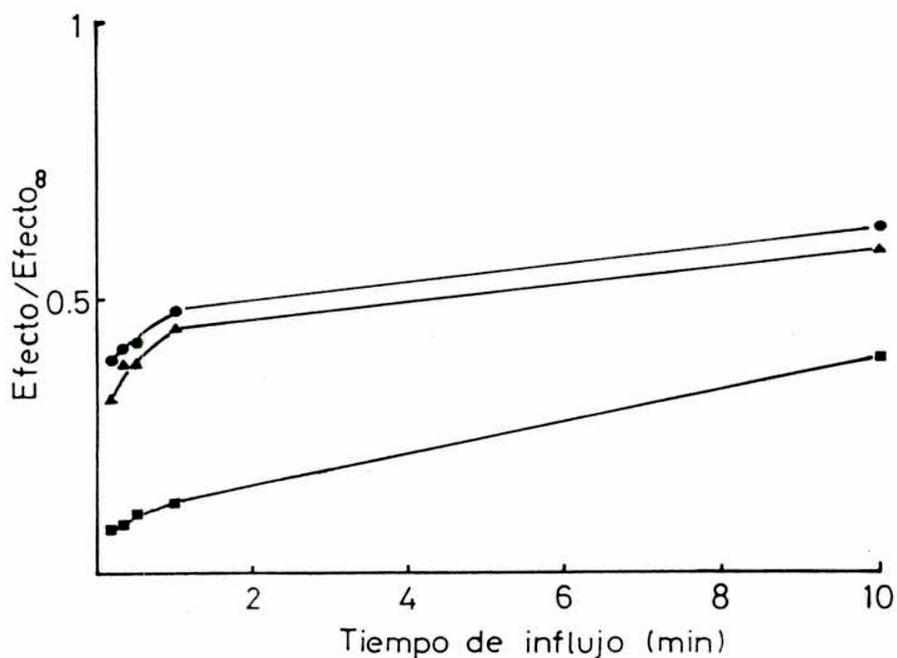
CURSO TEMPORAL DE LA INACTIVACION DE LA RESPUESTA DEL RECEPTOR
NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIFOSOMAS



Las vesículas de asolectina conteniendo receptor fueron preincubadas con Carb 1 μ M (▲); 5 μ M (■); 10 μ M (●) y 5 μ M en presencia de Cl_2Ca 1 mM (□) por los tiempos especificados y luego se midió el influjo de $^{86}Rb^+$ estimulado por Carb 1 mM a 10 segundos. En los experimentos en presencia de calcio, la solución empleada en la reconstitución del receptor y en los ensayos fue solución A sin EDTA y suplementada con Cl_2Ca 1 mM. Cada punto representa la media de dos determinaciones.

FIGURA 4

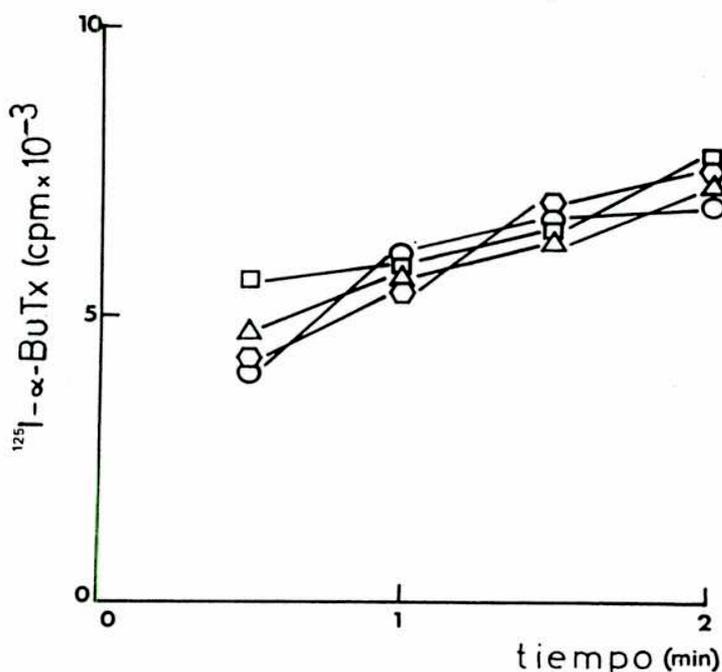
LOS EFECTOS DE PREINCUBAR LIPOSOMAS CONTENIENDO RECEPTOR NICOTINICO CON AMANTADINA Y QM SOBRE EL INFLUJO IONICO ESTIMULADO POR CARB



Las membranas conteniendo receptor se incubaron con solución A () amantadina 10^{-4} M (\blacktriangle) o QM 10^{-4} M (\blacksquare) durante 20 minutos a 0°C , y luego se midió el influjo de $^{86}\text{Rb}^{+}$ por los tiempos especificados. Los resultados se expresan como efecto/efecto₄₈ en función del tiempo de influjo. El efecto₄₈ se refiere al influjo de ^{86}Rb medido a las 48 horas, cuando el isótopo se ha equilibrado entre el interior y el exterior de las vesículas. Cada punto representa la media de dos determinaciones.

FIGURA 5

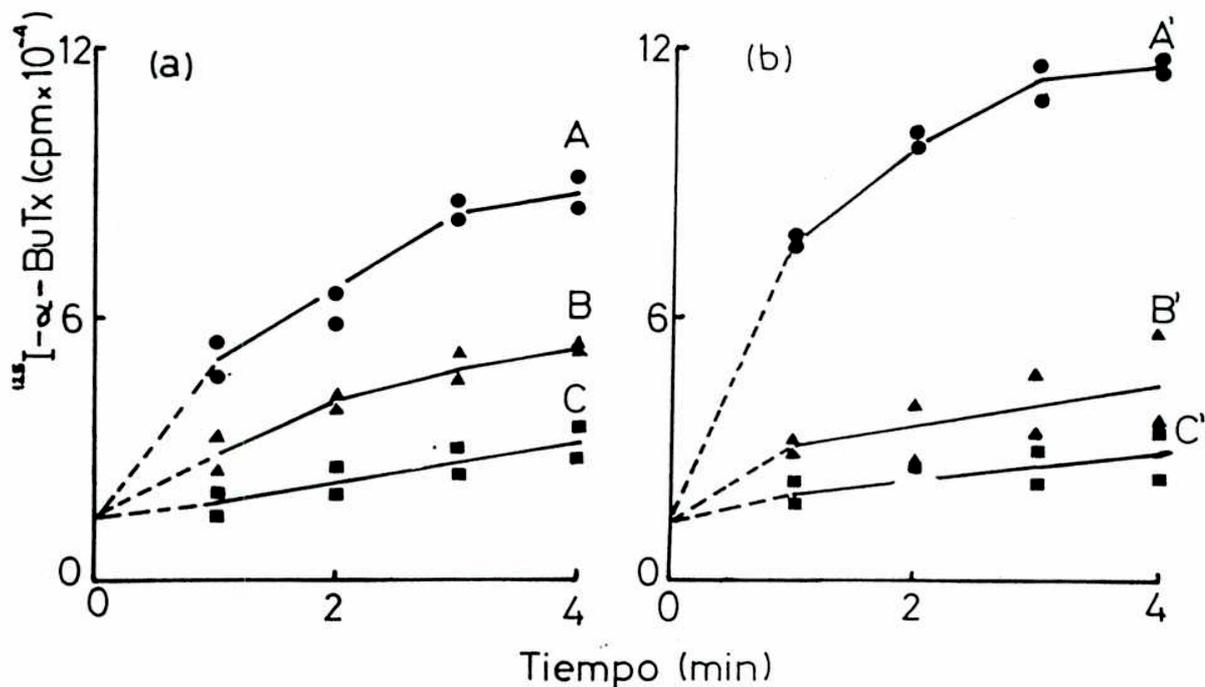
EL EFECTO DE COINCUBAR EL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIPOSOMAS CON AMANTADINA SOBRE LA VELOCIDAD DE FIJACION DE $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$



La reacción se llevó a cabo en ausencia (Control, ○) o en presencia de amantadina 10^{-6} M (□), 10^{-5} M (△) y 10^{-4} M (◇). Los resultados corresponden a la media de determinaciones realizadas por duplicado. Resultados similares se obtuvieron en experimentos en los cuales las membranas se preincubaron con amantadina a las mismas concentraciones durante 20 minutos a 0°C y posteriormente se midió la velocidad de fijación de $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTx}$.

FIGURA 6

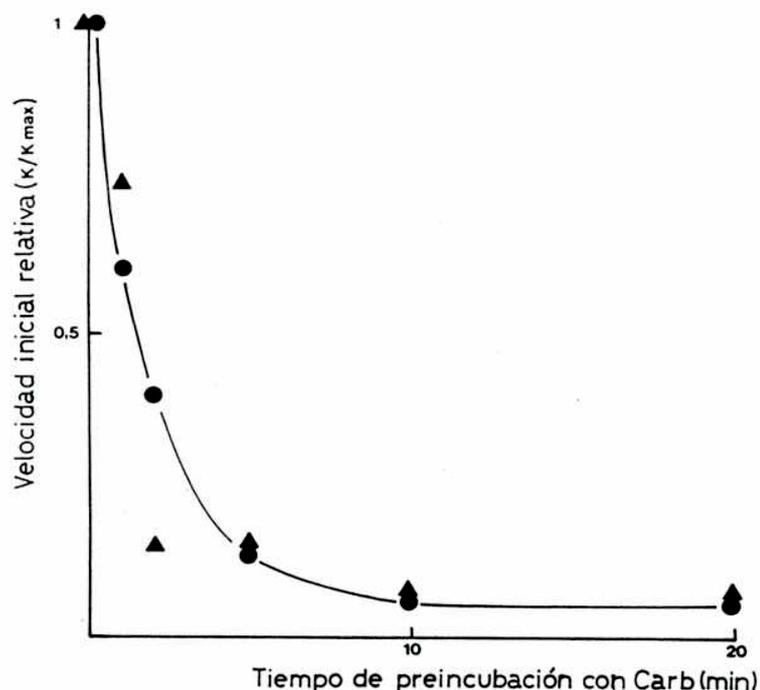
EL EFECTO DE PREINCUBAR RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIFOSOMAS CON AMANTADINA SOBRE LAS TRANSICIONES DE AFINIDAD INDUCIDAS POR CARB



Las vesículas conteniendo receptor incorporado se incubaron con solución A (a) o con amantadina 10^{-4} M (b) durante 20 minutos a 0°C . Luego de la preincubación las membranas se coincubaron con solución A (A, A') o Carb $10 \mu\text{M}$ (B, B') o se preincubaron con Carb $10 \mu\text{M}$ durante 30 minutos a 0°C (C, C') y posteriormente se midió la velocidad de fijación de ^{125}I - α -BuTx.

FIGURA 7

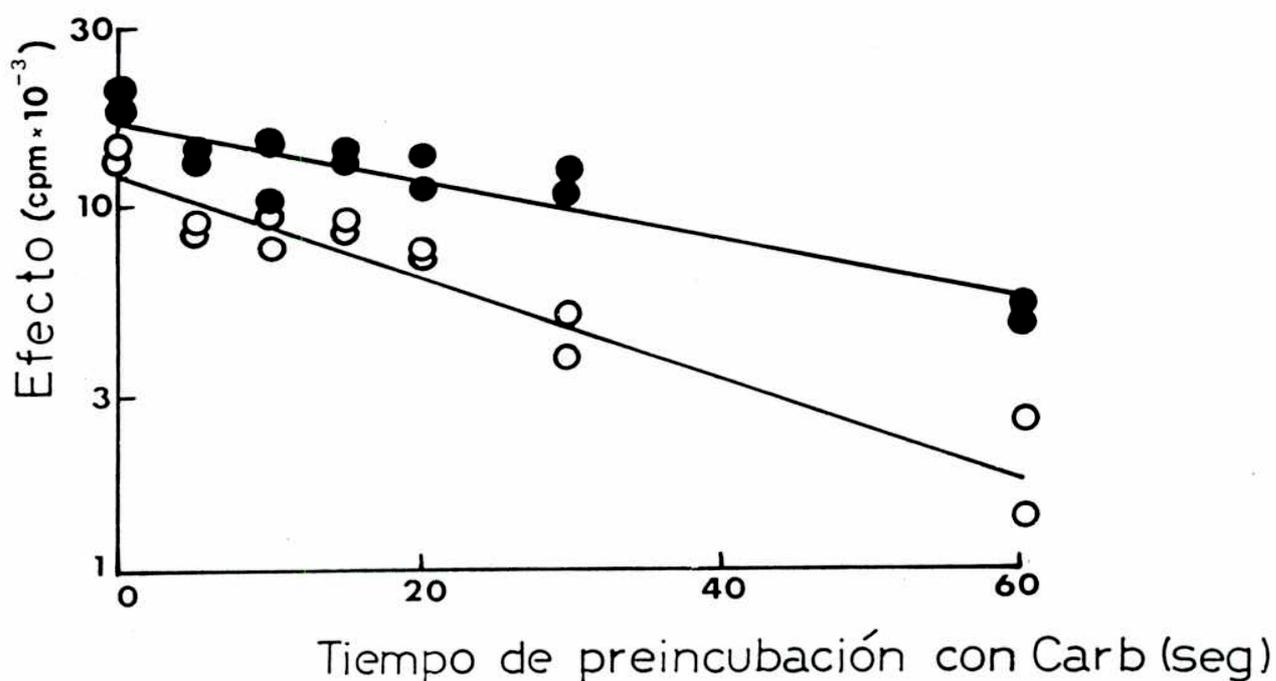
EL EFECTO DE LA AMANTADINA SOBRE EL CURSO TEMPORAL DE LAS TRANSICIONES DE AFINIDAD INDUCIDAS POR CARB



Se midió la velocidad de fijación de $[^{125}I]-\alpha\text{-BuTx}$ en presencia de Carb $10 \mu\text{M}$ (coincubación) y luego de preincubar el receptor con Carb $10 \mu\text{M}$ por los tiempos especificados. Las curvas de velocidad inicial se ajustaron por regresión lineal y se graficó la relación pendiente/pendiente máx. (que es equivalente a k/k_{max} (Walker y col., 1981 a) en función del tiempo de preincubación con Carb. El valor de pendiente máx. correspondió a la pendiente de la curva de coincubación (tiempo de preincubación cero). Membranas control (●). Membranas preincubadas con amantadina 10^{-4} M durante 20 minutos a 0°C (▲). Los valores corresponden a la media de determinaciones realizadas por duplicado.

FIGURA 8

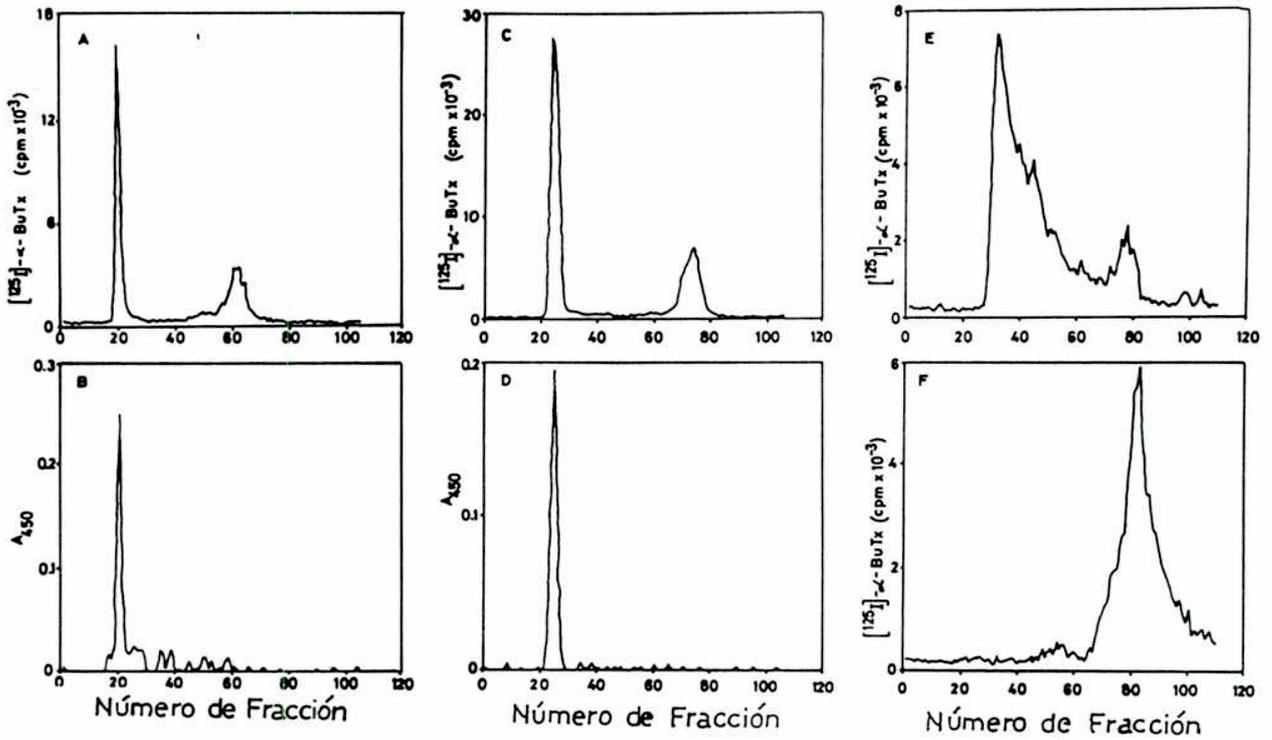
CURSO TEMPORAL DE LA INACTIVACION DE LA RESPUESTA DEL RECEPTOR
NICOTINICO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE AMANTADINA



Las membranas, preincubadas con solución A (●) o con amantadina 10^{-4} M (○) durante 15 minutos a 0 °C, se expusieron a Carb $5 \mu\text{M}$ por los tiempos especificados y luego se midió el influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ en presencia de Carb 1 mM. Los coeficientes de correlación y las pendientes fueron 0,90 y -0,008 para el control y 0,95 y -0,014 para las membranas tratadas con amantadina.

FIGURA 9

INCORPORACION DEL RECEPTOR NICOTINICO A LIFOSOMAS PREPARADOS POR
LOS METODOS DE DIALISIS DE COLATO Y DE PRECIPITACION CON PEG



Las filtraciones se realizaron a través de una columna de Bio-Gel-A-15m. Las muestras de liposomas conteniendo 5-6 μg de receptor se incubaron con 16 pmoles de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$ durante 45 minutos a temperatura ambiente y luego se pasaron a través de la columna, como se explicó en Materiales y Métodos. La muestra de toxina (F) contenía 8 pmoles de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$. A-B proteoliposomas preparados por el método de precipitación con PEG.

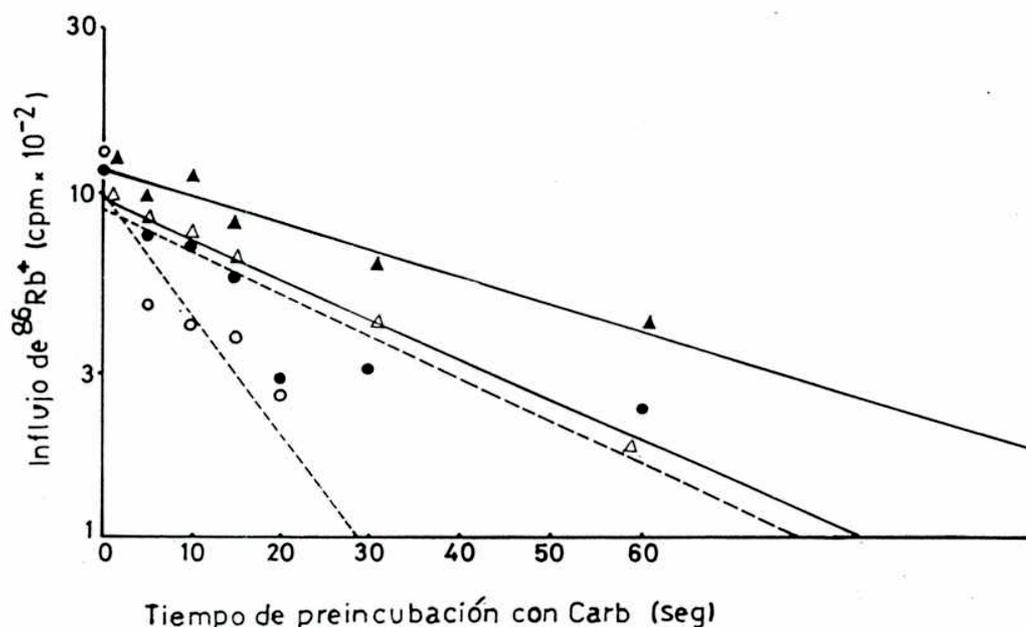
C-D proteoliposomas preparados por el método de diálisis de colato.

E receptor purificado en colato de sodio 1 %.

F $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$

FIGURA 10

EFFECTO DE LA TIMOPENTINA SOBRE LA VELOCIDAD DE INACTIVACION DEL
INFLUJO DE $^{86}\text{Rb}^+$ ESTIMULADO POR CARB



Las vesículas se prepararon en solución A o solución A + Cl_2Ca 1 mM sin EDTA (trazos continuos y punteados respectivamente). La velocidad de inactivación se midió en ausencia (símbolos negros) y en presencia (símbolos blancos) de Tp5 como se explicó en Materiales y Métodos. Las concentraciones de Tp5 fueron 10^{-5}M (Δ) para el experimento sin Ca^{2+} y 10^{-4}M (\circ) para el experimento en presencia de Ca^{2+} . Las rectas se ajustaron por regresión lineal considerando los valores por triplicado. Los puntos representados corresponden al promedio de 3 determinaciones. Los coeficientes de correlación fueron mayores de 0,80 en todos los casos.

DISCUSION

V.1. CARACTERIZACION DEL RECEPTOR NICOTINICO DEL ORGANO ELECTRICO DE *Discopyge tschudii*

El òrgano elèctrico de *D. tschudii* presenta características similares al de otras especies de rayas elèctricas en cuanto a ubicaciòn anatòmica y estructura macroscòpica.

Los estudios de microscopia electrònica de transmisiòn (Iraldi y col., 1984; Mendez y col., 1984) han revelado que la ultraestructura del òrgano elèctrico de *D. tschudii* es similar a la descrita en especies del gènere *Torpedo* (Sheridan, 1965).

La existencia de marcadores altamente especificos del receptor nicotínico, como lo son las toxinas curaremimèticas, han permitido la localizaciòn, purificaciòn y caracterizaciòn de este receptor. En efecto, la α -BuTx y otras toxinas de serpientes se unen en forma especifica y casi irreversible al receptor nicotínico del mùsculo esquelètico de vertebrados (referencias en Lee, 1979) y del òrgano elèctrico de peces (Changeux y col., 1970; Miledi y col., 1971).

Se han descrito varios mètodos para la preparaciòn de fragmentos de membranas ricos en receptor nicotínico de òrgano elèctrico de especies del gènere *Torpedo*. En todos ellos la separaciòn de dichos fragmentos es el resultado de la alta densidad de las membranas que contienen receptor (1,18 g/ml) comparada con la densidad promedio de las membranas de la electroplaca (1,14 g/ml) (Hartig y Raftery, 1979).

El primer paso en el estudio del receptor nicotínico del órgano eléctrico de D. tschudii consistió en la aplicación de una técnica de fraccionamiento, empleando centrifugaciones a baja y alta velocidad, y en gradientes de sacarosa, para la preparación de fracciones de membranas del mencionado tejido parcialmente purificadas.

La mayor fijación de [^{125}I]- α -BuTx y la menor actividad de ACE observadas en la fracción media de los gradientes de sacarosa (fracción B) comparados con las fracciones superior (A) e inferior (C) indica que se puede obtener una fracción de membranas enriquecida en receptor nicotínico del órgano eléctrico de D. tschudii. La fijación de α -BuTx a la fracción B de membranas fue bloqueada por el tratamiento previo de las mismas con α -CTX no radiactiva lo que indica la especificidad de la unión de la α -BuTx a dichas membranas. La posibilidad de obtener una fracción de membranas enriquecida en receptor resulta importante para realizar estudios bioquímicos y biofísicos del mismo en su membrana nativa.

La función del receptor nicotínico es traducir la unión de la acetilcolina en la apertura de un canal por el cual los iones Na^+ y K^+ atraviesan la membrana. Dicha respuesta es bloqueable por antagonistas y se inactiva por la presencia prolongada de agonistas. Este último fenómeno se denomina desensibilización.

El receptor en la fracción B de membranas, exhibió influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb. La respuesta fue bloqueada por d-TC y se desensibilizó por incubación previa de las membranas con Carb. Esto muestra que el receptor presente en las membranas del órgano eléctrico de D. tschudii manifiesta funciones características del receptor nicotínico.

Con el objeto de su purificación y reconstitución en membranas artificiales, el receptor fue extraído de la membrana mediante el empleo del detergente iónico colato de sodio pues dicho detergente preserva tanto sus propiedades de fijación de ligandos como de permeabilidad iónica (McNamee y col., 1986).

El material extraído y purificado por cromatografía de afinidad presentó un aumento de la fijación específica de [125 I]- α -BuTx de 10 a 20 veces con respecto a las membranas nativas, lo cual demuestra la eficacia del método de purificación utilizado.

Los valores de fijación específica (expresada en nmoles de α -BuTx/ mg proteína) en el material purificado del órgano eléctrico de D. tschudii resultaron menores que los informados para el receptor nicotínico purificado de otras fuentes, los que oscilan entre 6 y 12 nmoles de sitios/ mg de proteína. Para el receptor purificado del órgano eléctrico de I. californica la fijación de toxina medida por un ensayo de filtración en geles es de 8 nmoles/mg proteína (McNamee y col., 1975), valor coherente con la existencia de dos sitios por monómero de receptor. Valores de fijación de α -BuTx comparables a los observados en el presente trabajo fueron informados en muestras de receptor purificado de I. californica conteniendo asolectina (Ochoa y col., 1983).

Dado que los lípidos con carga neta negativa se unen al grupo funcional dietilaminoetil (DEAE) (Lindstrom y col., 1980), la interacción de los lípidos de la asolectina con los filtros DEAE puede explicar los menores valores de fijación de α -BuTx obtenidos. Las preparaciones de [125 I]- α -BuTx pueden diferir en cuanto a los procedimientos de obtención, purificación y marcación radiactiva de la toxina, lo cual puede resultar en diferentes

propiedades de fijación de la misma al receptor y en consecuencia en una variación de la fijación específica del receptor purificado informada por los distintos laboratorios. La utilización de un ensayo de filtración a través de filtros de papel para separar el complejo toxina-receptor de la toxina libre puede también contribuir a la baja actividad específica. En tal sentido, Karlin (1980) señaló que al utilizar filtros se supone que toda la proteína queda retenida en los mismos lo que en realidad no ocurre y conduce a subestimar los valores de fijación específica. Los ensayos en los cuales la separación se hace por centrifugación o a través de columnas permiten medir la cantidad de proteína en cada muestra lográndose así una valoración directa de la actividad específica.

La presencia de proteínas contaminantes en el material eluido de la columna de afinidad como causante de la menor actividad específica resulta poco probable debido a que el análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida de dicho material sólo reveló la presencia de las cuatro bandas características del receptor nicotínico. En tal sentido, Lindstrom y col. (1980) consideran que el análisis en geles de poliacrilamida es un índice de pureza del receptor más confiable que la fijación de toxina. La presencia de cuatro bandas de 41,2, 49,5, 60,0 y 66,3 Kdaltons en el material purificado del órgano eléctrico de D. tschudii revela una gran similitud con el receptor de I. californica el cual está compuesto por cuatro tipos de subunidades de 39, 48, 58 y 64 kdaltons (Weill y col., 1974). Otras especies pertenecientes a los géneros Torpedo y Narcine presentan un patrón similar de subunidades (ver Tabla 2 en Karlin, 1980).

Los experimentos de purificación mostraron, además, que se puede extraer, en promedio, 3,5 mg de receptor puro a partir de 100 g de tejido de órgano eléctrico eléctrico de D. tschudii. Los mayores rendimientos (7,4 mg de receptor puro) se obtuvieron con columnas de afinidad recientemente preparadas y se asemejan a los informados (5 a 8 mg/100 g de tejido) para el receptor del órgano eléctrico de I. californica (Ochoa y col. (1983) .

El estudio de la composición de aminoácidos del receptor nicotínico purificado del órgano eléctrico de D. tschudii mostró que las subunidades que lo conforman poseen un contenido relativamente elevado de aminoácidos hidrofóbicos. Esta composición aminoacídica es similar a la informada por Lindstrom y col. (1979) y Vandlen y col. (1979) para el receptor del órgano eléctrico de I. californica.

El análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS, del material purificado constituye, además, una prueba de la integridad de la molécula de receptor luego de su purificación ya que la degradación por enzimas proteolíticas del receptor tiene mínimos efectos sobre las propiedades de unión de ligandos al receptor y por lo tanto no es evidenciable por los ensayos de fijación de α -BuTx (McNamee y col., 1986).

Sin embargo los mejores indicadores de la integridad funcional del receptor purificado son el flujo de iones estimulado por Carb y de transiciones de afinidad para agonistas en membranas reconstituidas. Estas propiedades, como se discutirá en la siguiente sección, fueron manifestadas por el receptor nicotínico extraído del órgano eléctrico de D. tschudii, purificado y reconstituido en vesículas lipídicas.

V.2 RECONSTITUCION DEL RECEPTOR NICOTINICO EN LIFOSOMAS

Los estudios de influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb demuestran que el receptor incorporado a liposomas conserva su capacidad de translocar iones en respuesta al agonista, e indican, además, que una fracción significativa de las moléculas del receptor se ubica con los sitios de fijación de agonistas orientados hacia la superficie externa de las vesículas. Los experimentos de orientación de sitios realizados en el presente trabajo demuestran, que en efecto, un 80 % de los sitios que fijan $\alpha\text{-BuTx}$ en las muestras reconstituidas se orientan hacia el exterior de las vesículas. Estos resultados corroboran los informados por otros autores para muestras reconstituidas de receptor nicotínico de T. californica (Lindstrom y col., 1980; Anholt y col., 1981). Anholt y col. (1981) demostraron, además, que todas las moléculas de receptor se orientan hacia el mismo lado en una misma vesícula. Las causas del ordenamiento de las moléculas de receptor en forma preferencial hacia el exterior de las vesículas y hacia un mismo lado en de una misma vesícula no se conocen todavía.

Para realizar determinaciones de flujo iónico es conveniente que el tamaño de las vesículas sea lo mayor posible de modo que la amplitud de la respuesta se incremente. Las vesículas conteniendo receptor nicotínico purificado del órgano eléctrico de D. tschudii presentaron una respuesta aumentada y un volumen interno mayor luego de un ciclo de congelación y descongelación, resultados que concuerdan con observaciones previas de otros autores. En efecto, Anholt y col. (1982) demostraron, por filtración en geles y por observaciones al microscopio electrónico, que el tamaño de las vesículas conteniendo receptor

nicotínico aumenta luego de ser congeladas y descongeladas. Ochoa y col. (1983) estudiaron el efecto de la congelación y descongelación sobre el influjo de iones estimulado por Carb y el volumen interno de vesículas reconstituidas de diferente composición lipídica conteniendo receptor nicotínico y observaron que ambos aumentan para todas las mezclas de lípidos ensayadas. Ha sido descrito que la congelación y descongelación produce la fusión de vesículas compuestas por lípidos puros (Pick, 1981). Estas evidencias indican que el aumento del volumen interno observado luego de la congelación y descongelación se debería a la fusión de las vesículas. El aumento en el volumen interno de las vesículas puede explicar, al menos en parte, el aumento de la respuesta luego de la congelación.

Los estudios de velocidad de fijación de α -BuTx han permitido evaluar los estados de afinidad del receptor de D. tschudii reconstituido en liposomas.

El receptor presente en el órgano eléctrico de especies del género Torpedo exhibe transiciones entre un estado de baja afinidad para agonistas y un estado de alta afinidad en presencia prolongada de agonistas (Weber y col., 1975; Weiland y col., 1976). Este fenómeno se ha correlacionado con la desensibilización fisiológica descrita por primera vez por Katz y Thesleff en 1957 (Weber y col., 1975; Weiland y col., 1976; 1977; Quast y col., 1978; Weiland y Taylor, 1979).

La mayor capacidad de la Carb para disminuir la velocidad de fijación de α -BuTx en condiciones de preincubación con respecto a las de coincubación indica que el receptor de D. tschudii incorporado a liposomas manifiesta cambios de afinidad para agonistas por presencia prolongada de los mismos. Los valores

de las constantes de baja afinidad (K_1) y de alta afinidad (K_2) para agonistas calculados en este trabajo concuerdan con los informados para el receptor de T. californica reconstituido en vesículas de asolectina (Fong y McNamee, 1986). El estudio del curso temporal de los cambios de afinidad mostró que la velocidad relativa de fijación de α -BuTx depende del tiempo de preincubación con Carb y que las transiciones de afinidad se completan a los 10 minutos de preincubación con Carb.

La desensibilización del receptor nicotínico de Torpedo sp., tanto en membranas nativas (Walker y col., 1981 b) como en membranas reconstituidas (Walker y col., 1982), ocurre en dos etapas: una rápida (en el orden de milisegundos) y una lenta (en el orden de segundos). Es decir, la desensibilización rápida no conduce a una pérdida completa de la actividad de flujo iónico mientras que la preincubación con Carb por tiempos más largos, comparados con la etapa rápida, produce una disminución mayor de la amplitud de la respuesta a Carb (Walker y col., 1982). En el presente trabajo se midió el proceso de inactivación lenta del receptor de D. tschudii reconstituido en liposomas. La velocidad de dicho proceso dependió de la concentración de Carb y se incrementó en presencia de Ca^{2+} .

El Ca^{2+} acelera la desensibilización del receptor nicotínico en el músculo esquelético (Manthey, 1966; Magazanick y Vyskocil, 1970) y en fragmentos de membranas de órgano eléctrico de T. marmorata (Sugiyama y col., 1976), dicho catión aumenta, además, la afinidad del receptor nicotínico para los agonistas (Cohen y col., 1974; Miller y col., 1979), lo que es consistente con su efecto sobre la desensibilización.

El mecanismo por el cual el Ca^{2+} acelera la

desensibilización del receptor nicotínico no se conoce todavía. Se ha postulado que la acción del Ca^{2+} es promover el estado inactivo de receptor (Manthey, 1966). Magazanick y Vyskocil (1970) sugirieron que el incremento en la velocidad de inactivación del receptor producido por el Ca^{2+} y otros cationes bi y trivalentes, como Ba^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} y La^{3+} , se debería a su acumulación en la membrana y a la unión de los mismos a los grupos fosfato de los fosfolípidos formando complejos que modificarían el funcionamiento del canal.

El fenómeno de desensibilización persiste luego de la purificación y reconstitución del receptor en vesículas lipídicas (Walker y col., 1982) y por lo tanto constituye una propiedad intrínseca del receptor. En el presente trabajo se ha demostrado que el incremento de la velocidad de desensibilización inducido por el Ca^{2+} , observado anteriormente por técnicas electrofisiológicas en preparaciones neuromusculares y por técnicas bioquímicas en fragmentos de membranas de T. marmorata, también se manifiesta en muestras reconstituidas conteniendo receptor purificado.

Los resultados mostrados indican que el receptor del órgano eléctrico de D. tschudii posee varias características en común con el receptor del órgano eléctrico de especies del género Torpedo, y que aquél puede ser reconstituido en liposomas conservando sus propiedades de fijación de ligandos, de translocación de iones, y de inactivación en presencia prolongada de un agonista colinérgico.

Mediante experimentos de cinética rápida se podría llevar a cabo un análisis más detallado de las propiedades funcionales del receptor nicotínico del órgano eléctrico de D.

tschudii. Estas técnicas permiten medir el flujo de iones en el orden de los milisegundos, rango de tiempo en el cual ocurren los fenómenos de activación y desensibilización rápida del receptor. De esta forma se podrían calcular parámetros de la cinética de activación y de inactivación y compararlos con los obtenidos en el receptor del órgano eléctrico del género Torpedo mediante dichas técnicas y los obtenidos en el receptor del músculo esquelético mediante determinaciones electrofisiológicas.

V.3 EFECTO DE LA AMANTADINA SOBRE EL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIPOSOMAS.

La respuesta de la membrana postsináptica a la acetilcolina en la unión neuromuscular y en las sinapsis del órgano eléctrico es bloqueada por una serie de compuestos denominados bloqueantes no competitivos, que ejercen su acción uniéndose a sitios distintos del sitio de unión de dicho neurotransmisor.

La amantadina es una droga que inhibe las infecciones de varios tipos del virus de la influenza (Davies y col., 1964), impide la entrada del virus de la estomatitis vesicular a células de ratón en cultivo (Schlegel y col., 1982) y es utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Grelak y col., 1970).

La amantadina tiene efecto, además, sobre la unión neuromuscular reduciendo la respuesta de la membrana muscular a la acetilcolina (Nastuk y col., 1976). Esta droga bloquea la transmisión neuromuscular en la rata y en la rana, inhibe la fijación de [^3H]-perhidrohistriónicotoxina a membranas del órgano eléctrico del género Torpedo, y sin embargo no modifica la fijación de [^3H]-acetilcolina a dichas membranas (Albuquerque y

col., 1978; Tsai y col., 1978; Warnick y col., 1982). Estos resultados sugieren que la amantadina interactúa con un componente de la membrana postsináptica diferente del sitio de unión de la acetilcolina.

El receptor purificado y reconstituido en liposomas constituye un sistema en el cual las funciones de fijación de ligandos y de translocación de iones pueden ser medidas en la misma preparación la cual está constituida por una única proteína incorporada a una matriz lipídica de composición definida (McNamee y Ochoa, 1982; McNamee y col., 1986). Este sistema resulta adecuado, entonces, para el estudio del efecto sobre el receptor nicotínico de drogas tales como los bloqueantes no competitivos.

Mediante el empleo de receptor nicotínico purificado y reconstituido en liposomas, Ochoa (1983) demostró que la amantadina reduce el influjo iónico estimulado por Carb pero no afecta la fijación de α -BuTx en equilibrio, sugiriendo la naturaleza no competitiva de la acción de esta droga. Estos resultados fueron confirmados en el presente trabajo.

Si bien es claro, por los resultados de los experimentos de fijación de [125 I]- α -BuTx y de influjo de 86 Rb $^{+}$ estimulado por Carb mostrados en el presente trabajo y por evidencias presentadas por otros autores (Albuquerque y col., 1978; Tsai y col., 1978; Ochoa, 1983), que la amantadina es un bloqueante no competitivo del receptor nicotínico, el sitio de unión de esta droga no se conoce todavía. En tal sentido, resultaría interesante realizar estudios de fijación en equilibrio de amantadina marcada isotópicamente, de forma tal de conocer el número y ubicación de los sitios, y la afinidad con la cual esta droga se une a dichos sitios. También se podría estudiar la cinética de asociación y de

disociación, y en el caso de que la droga en cuestión se una al receptor se podría conocer a cuál de las subunidades se fija mediante experimentos de marcado covalente con amantadina radiactiva.

Heidmann y col. (1983 b) estudiaron la fijación de varios bloqueantes no competitivos marcados con isótopos radiactivos a membranas ricas en receptor de Torpedo sp. y postularon la existencia de un sitio de alta afinidad, presente en una única copia por monómero de receptor y de sitios de baja afinidad presentes en número de 10 a 30 por monómero. Earnest y col. (1984) demostraron por espectroscopia de resonancia de espín electrónico utilizando un marcador de espín análogo de un anestésico local, que existen al menos dos clases de sitios de distinta afinidad por dicho compuesto en membranas reconstituidas conteniendo receptor purificado.

Suponiendo que la amantadina se une a alguno de los sitios mencionados, el efecto inhibitorio producido por esta droga sobre el influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ podría deberse a uno o más de los siguientes mecanismos:

- 1) Un bloqueo directo del canal, similar al propuesto para los anestésicos locales cuando se unen al conformero del receptor en el cual el canal está abierto (Katz y Miledi, 1975; Adams, 1977, Neher y Steinbach, 1978).
- 2) Un cambio conformacional inducido por la unión de la amantadina a un sitio distinto del sitio de unión de la acetilcolina y que lleve al receptor a un estado en el cual el canal se encuentre cerrado. Este mecanismo alostérico podría involucrar un cambio en el equilibrio entre conformaciones preexistentes del receptor en ausencia de acetilcolina hacia la forma desensibilizada o un

aumento de la velocidad de desensibilización inducida por el agonista.

3) Una interacción indirecta a través de los lípidos que rodean al receptor, dado que se ha demostrado que el colesterol y los fosfolípidos con carga negativa son indispensables para el funcionamiento normal del receptor (Ochoa y col., 1983; Criado y col., 1984; Fong y McNamee, 1986).

Los resultados serán discutidos en base a los mecanismos 1) y 2) ya que no se ha estudiado la interacción de la amantadina con los lípidos de la membrana.

Los resultados de los experimentos de fijación de α -BuTx en presencia de amantadina muestran que esta última no modifica la velocidad de fijación de la toxina al receptor, lo que indica que la amantadina aún a concentraciones de 10^{-3} M no interactúa con el sitio de fijación de la acetilcolina, corroborando lo observado en los experimentos de fijación de α -BuTx en equilibrio. Por el contrario la QM y la procaina inhiben la fijación en equilibrio y la velocidad de fijación de la α -BuTx respectivamente indicando que ambas drogas interactúan en cierta medida con el sitio de acetilcolina.

El receptor reconstituido exhibe transiciones de afinidad luego de la exposición del mismo a la amantadina, siendo las diferencias entre las curvas de preincubación y coincubación menos evidentes que en ausencia de esta droga. Estas observaciones sugieren que la amantadina no ejerce un efecto alostérico tal que lleve al receptor a un estado desensibilizado. Sin embargo, no se puede descartar que la amantadina altere el equilibrio entre los estados de baja y de alta afinidad para agonistas, favoreciendo el establecimiento de este último estado. Heidmann y col. (1983 b)

han demostrado, mediante estudios de fijación rápida del agonista nicotínico fluorescente Dns-C₆-Cho a fragmentos de membranas de órgano eléctrico de T. marmorata, que los bloqueantes no competitivos fenciclidina, meproadifen, trimetisoquina, clorpromazina y Tritón X-100 aumentan la fracción de sitios de alta afinidad que existen en la membrana previamente al agregado del agonista. Experimentos de este tipo aplicados al estudio del efecto de la amantadina sobre el receptor nicotínico resultarían interesantes para dilucidar si esta droga produce un cambio similar en el equilibrio entre los estados de afinidad del receptor.

El curso temporal de las transiciones de afinidad inducidas por Carb que se correlacionan con el fenómeno fisiológico de desensibilización (Weber y col., 1975; Weiland y col., 1976; 1977; Quast y col., 1978; Weiland y Taylor, 1979) puede ser medido mediante el ensayo de fijación de α -BuTx. El fenómeno de desensibilización del receptor puede ser evaluado en forma directa mediante el ensayo de influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ (Walker y col., 1982). Si bien no se observaron diferencias en el curso temporal de las transiciones de afinidad inducidas por Carb en presencia de amantadina, los experimentos de influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ muestran que la droga produce un incremento en la velocidad de desensibilización. Es decir el ensayo de influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ se reveló como un procedimiento más sensible para la detección de los efectos de la amantadina sobre el receptor. Dado que las transiciones de afinidad y la inactivación del receptor están correlacionados, es muy probable que la amantadina produzca cambios en el desarrollo de la transiciones de afinidad que no han sido evidenciados con la técnica empleada.

Los resultados de los experimentos en los cuales se midió la velocidad de inactivación de la respuesta del receptor en presencia de amantadina indican que esta droga aumenta la velocidad del proceso de desensibilización inducido por Carb y sugieren que la amantadina se fija a la forma abierta del canal. Es decir, cuando el canal se abre como consecuencia de la fijación del agonista al receptor, la amantadina se uniría a un sitio ubicado dentro del canal que podría ser el sitio de "alta afinidad" para bloqueantes no competitivos descrito por Heidmann y col. (1983 b), promoviendo un cambio conformacional hacia el estado desensibilizado en el cual el canal se encuentra cerrado.

La observación de que la amantadina acelera la velocidad de desensibilización del receptor nicotínico está apoyada por los hallazgos de otros autores utilizando distintos bloqueantes no competitivos del receptor. En efecto, el anestésico local SKF-525A acelera la velocidad de desensibilización medida por el eflujo de $^{22}\text{Na}^+$ de vesículas de membranas de T. marmorata (Sugiyama y col., 1976). Un efecto similar fue observado para la histrionicotoxina sobre el receptor de células musculares de pollo en cultivo (Burgermeister y col. 1977), y para la histrionicotoxina y los anestésicos locales QX314 y dibucaina en clones de células musculares BC3H-1 (Sine y Taylor, 1982). Karpen y col. (1982) demostraron mediante técnicas de cinética rápida que la cocaína, la procaína y la fenciclidina disminuyen la velocidad inicial de flujo de iones inducido por el agonista en membranas nativas de E. electricus, y que la fenciclidina, que se une al sitio de alta afinidad para bloqueantes no competitivos (Heidmann y col., 1983 b; Oswald y col., 1983), aumenta, además, la velocidad de desensibilización del receptor.

Resultaría interesante conocer si la amantadina produce un bloqueo directo del canal y en tal caso cuánto contribuye dicho bloqueo a la inhibición total inducida por esta droga. Un experimento que puede evidenciar si existe un bloqueo estérico es medir la velocidad de la etapa rápida de desensibilización en presencia de amantadina mediante ensayos de cinética rápida y compararla con la velocidad de cierre del canal en ausencia de esta droga. Es interesante conocer también si el cambio conformacional inducido por la amantadina y por otros bloqueantes no competitivos es similar al producido por el agonista cuando se une a su sitio ubicado en la subunidad α . En tal sentido, se pueden realizar estudios tendientes a calcular parámetros característicos del estado desensibilizado del receptor, tales como la constante de afinidad para agonistas, velocidad de recuperación del estado inactivo al eliminar el agonista, en presencia y en ausencia de amantadina.

El conocimiento detallado de los mecanismos de acción de los bloqueantes no competitivos del receptor nicotínico puede brindar información sobre la relación entre la fijación de ligandos y los fenómenos de apertura del canal, permeación iónica e inactivación de la respuesta, lo cual, al presente, queda por dilucidar.

IV.4 INCORPORACION DEL RECEPTOR NICOTINICO EN LIFOSOMAS POR EL METODO DE PRECIPITACION CON PEG

La reconstitución del receptor nicotínico en liposomas comprende la extracción de esta proteína de la membrana con el detergente colato de sodio y su inserción en vesículas lipídicas promovida por la eliminación del detergente. Los métodos más

comúnmente utilizados para eliminar el colato de sodio son: diálisis (Epstein y Racker, 1978), dilución (Huganir y col., 1979) y filtración en geles (Huganir y Racker, 1982).

La precipitación con PEG permite la separación de la proteína y de los lípidos del detergente. Este método ha sido utilizado en la reconstitución de otros sistemas receptores: el receptor adrenérgico de tipo α_2 del cerebro de la rata y del ternero (Kremenetzky y Atlas, 1984) y el receptor muscarínico de la zona atrial del corazón bovino (Aguilar y Ochoa, 1986).

En el presente estudio se aplicó el método de precipitación con PEG con el objeto de incorporar el receptor nicotínico del órgano eléctrico de D. tschudii a liposomas de asolectina, a los efectos de estudiar si nuevas técnicas de reconstitución son aplicables al receptor nicotínico y de obtener un mayor conocimiento del funcionamiento de dicho receptor en vesículas preparadas en distintas condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos indican que el receptor se incorporó a los liposomas y que se orientó correctamente, es decir con los sitios de fijación de agonistas hacia el exterior de las vesículas. El receptor incorporado conservó la propiedad de fijación de $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-BuTx}$, siendo la constante de velocidad de segundo orden (k_T) y la constante de baja afinidad para Carb (K_1) comparables con las calculadas para el receptor nicotínico reconstituido por el método de diálisis de colato. Sin embargo, el receptor reconstituido con PEG no exhibió transiciones de afinidad ni influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por Carb.

El PEG es un polímero sintético soluble en agua que ha sido utilizado para la purificación de proteínas por precipitación fraccionada. La acción precipitante del PEG se debe primariamente

a un mecanismo de volúmen excluido (Atha e Ingham, 1981). Esto es, las proteínas son excluidas en forma estérica de regiones del solvente que son ocupadas gradualmente por el polímero. Así las proteínas son concentradas hasta que se excede su solubilidad y precipitan. No existen interacciones directas que involucren fuerzas de atracción y repulsión entre las proteínas y el polímero (Atha e Ingham, 1981). El PEG forma uniones de hidrógeno con las moléculas de agua, reduciendo la concentración de agua libre, efecto que también contribuye a la concentración de las proteínas (Blow y col., 1978).

Se han descrito varios efectos del PEG sobre los lípidos. Este polímero produce la agregación de lípidos dispersados por sonicación debido probablemente también a un mecanismo de exclusión estérica y promueve el intercambio de lípidos entre vesículas lipídicas (Tilcock y Fisher, 1982); produce deshidratación de bicapas de fosfatidilcolina y disminuye el potencial de membrana en fantasmas de eritrocitos (Arnold y col., 1983); promueve la fusión de membranas de fibroblastos (Blow y col., 1978) y de liposomas unilamelares de fosfatidilcolina y fosfatidilserina (Boni y col., 1981) y tiene, además, una acción similar a la de algunos detergentes produciendo lisis de vesículas lipídicas y ensamblaje de las mismas en estructuras de mayor tamaño (Sáez y col., 1982).

Varias observaciones sugieren la integridad de la molécula de receptor nicotínico luego del tratamiento con PEG: 1) El PEG a una concentración de 25 % no interactúa con proteínas tales como la albúmina de suero bovino y la ribonucleasa (Atha e Ingham, 1981). 2) Se ha observado en el presente trabajo que las propiedades de fijación de α -BuTx del receptor nicotínico en

vesículas preparadas por el método de precipitación con PEG son comparables con las descritas tanto en membranas nativas como en membranas reconstituidas por el método de diálisis (Walker y col., 1981 a; Fong y McNamee, 1986; y el presente trabajo). 3) En el presente trabajo se mostraron evidencias de que el PEG no modifica la fijación de [125 I]- α -BuTx al receptor ni la actividad de la enzima ACE.

La falta de respuesta (influjo de iones estimulado por Carb y transiciones de afinidad) que se observó en el receptor incorporado a liposomas por precipitación con PEG se puede explicar por: 1) Un volumen muy pequeño de las vesículas. Esto provoca un equilibrio rápido de los iones entre el exterior y el interior de las mismas y por lo tanto la imposibilidad de detectar una respuesta inducida por Carb. 2) Una pérdida excesiva de sitios durante el procedimiento de reconstitución. 3) La expresión de un estado desensibilizado del receptor inducido por el PEG y/o por el procedimiento de reconstitución. 4) Una alteración de las moléculas de los lípidos que rodean al receptor, que se sabe son importantes para la función del receptor.

En cuanto a la primera posibilidad, los resultados mostrados en el presente trabajo indican que mediante el método de precipitación con PEG se obtienen vesículas cuyo volumen interno es mayor que el de las vesículas preparadas por el método de diálisis. La observación al microscopio electrónico de vesículas de asolectina conteniendo receptor muscarínico preparadas por el método de precipitación con PEG revela que las mismas son unilamelares y poseen un diámetro comprendido entre 83 y 500 nm (Pellegrino de Iraldi y col., 1986). Estas observaciones y las determinaciones del volumen de equilibrio realizadas en el

presente trabajo, sugieren que la falta de respuesta observada no se debe a la formación de vesículas de pequeño tamaño.

Las determinaciones de fijación de α -BuTx indican que durante el procedimiento de reconstitución por precipitación con PEG se produce una pérdida de aproximadamente 50 % de los sitios que fijan esta toxina. Sin embargo, a pesar de dicha pérdida, las muestras de proteoliposomas preparados por el método de precipitación con PEG contenían 2 a 2,5 veces más sitios receptores que las preparadas por el método de diálisis. Esto demuestra que la pérdida de sitios receptores observada durante la reconstitución por precipitación con PEG no es la causa de la falta de respuesta.

El valor de la constante de baja afinidad para Carb (K_1) del receptor reconstituido por precipitación con PEG es similar al determinado para el receptor en su membrana nativa y para el receptor reconstituido por otros métodos (Walker y col., 1981 a; Fong y McNamee, 1986). Esto indica que el PEG o el procedimiento de reconstitución no promueven en el receptor el establecimiento del estado desensibilizado que se caracteriza por su alta afinidad para Carb.

La posibilidad de que el PEG y/o alguna de las impurezas presentes en las preparaciones comerciales de PEG alteren las moléculas de los lípidos que rodean al receptor debe ser tenida en cuenta. La presencia de ciertos lípidos, tales como el colesterol y lípidos con carga negativa, es necesaria para el correcto funcionamiento del receptor (Ochoa y col., 1983; Criado y col., 1984; Fong y McNamee, 1986).

Las preparaciones comerciales de PEG contienen impurezas (Hamburger y col., 1975; Honda y col., 1981), tales como las

sustancias utilizadas para iniciar y terminar la polimerización del óxido de etileno, productos oligoméricos del PEG, productos de la descomposición oxidativa del PEG como aldehidos y ácidos, y antioxidantes agregados para prevenir la oxidación del PEG. Honda y col. (1981) observaron que el PEG pierde su propiedad fusógena cuando sus impurezas son extraídas con éter etílico. Estos autores encontraron que cuando un ácido graso tal como el ácido oleico reacciona con el PEG oligomérico a través de los grupos oxhidrilo terminales para formar polioxietilenoleato, se restaura la capacidad fusógena. El mismo resultado se obtiene al agregar ciertos antioxidantes a las muestras de PEG purificado.

Los resultados de los experimentos donde se midió la velocidad de fijación de α -BuTx y el influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ en muestras reconstituidas utilizando PEG purificado indican que son las impurezas y no el PEG las responsables de los efectos observados sobre las propiedades funcionales del receptor.

El análisis por cromatografía en placa delgada y por densitometría cuantitativa de los lípidos presentes en las muestras reconstituidas reveló que se produce una hidrólisis de los lípidos en los proteolíposomas preparados por precipitación con PEG que conduce a un aumento de la concentración de ácidos grasos libres. Aunque el origen de tal hidrólisis no se conoce, podría ser debida a las impurezas del PEG.

Los ácidos grasos libres bloquean la respuesta del receptor nicotínico en preparaciones de membranas de órgano eléctrico de *T. californica*, mientras que las transiciones de afinidad del receptor no se ven alteradas (Andreasen y McNamee, 1980). Los ácidos grasos de menos de ocho átomos de carbono suprimen la corriente de Na^+ en el axón gigante del calamar

(Takenaka y col. 1987). Estos autores postularon que los ácidos grasos se incorporan a la capa de lípidos de la membrana lo que resulta en una inhibición la corriente de Na⁺.

Dado que en el presente trabajo se observó que el receptor incorporado a vesículas lipídicas por el método de precipitación con PEG no exhibe transiciones de afinidad, es posible que otros factores además de la presencia de de ácidos grasos libres sean los responsables de los efectos observados. Probablemente, la imposibilidad del receptor de manifestar los cambios conformacionales que conducen a la apertura del canal y a la desensibilización se deba a un efecto combinado de las impurezas del PEG y de los ácidos grasos libres.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que el método de incorporación por precipitación utilizando preparaciones de PEG comerciales no resulta adecuado para la reconstitución de la función del receptor nicotínico en vesículas lipídicas. Cuando las preparaciones de PEG son purificadas, se recupera la capacidad del receptor reconstituido de manifestar los cambios conformacionales que conducen a la apertura del canal y a la desensibilización. Sin embargo el método de diálisis del colato, aunque más prolongado, resulta más conveniente para la reconstitución del receptor nicotínico, ya que el mismo no involucra el agregado a la mezcla de receptor y lípidos de sustancias que puedan alterar el normal funcionamiento del receptor.

V.5 EFECTO DE LA TIMOPENTINA SOBRE LA FUNCION DEL RECEPTOR NICOTINICO RECONSTITUIDO EN LIPOSOMAS.

La Tpo es un polipéptido que se puede aislar del timo

bovino (Goldstein, 1974). Además de sus efectos sobre el sistema inmune, esta hormona produce un bloqueo de la transmisión neuromuscular (Goldstein, 1974). Un pentapéptido sintético, denominado timopentina, cuya estructura primaria es idéntica a la secuencia correspondiente a los aminoácidos 32 a 36 de la TPO, reproduce los efectos de la hormona (Goldstein y col., 1979) incluyendo el bloqueo neuromuscular (Audhya y col., 1984).

Mediante el empleo de vesículas conteniendo receptor purificado como única proteína incorporada a las mismas y un ensayo manual de influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ que permite medir la respuesta del receptor a agonistas, se observó en el presente trabajo que la Tp5 acelera la velocidad a la cual el receptor se inactiva en presencia de Carb, siendo dicho efecto más evidente en presencia de Ca^{2+} .

Los experimentos de fijación de $\alpha\text{-BuTx}$ demuestran que el bloqueo del influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ observado en presencia de Tp5 no se debe a la fijación del pentapéptido al sitio de unión de la acetilcolina. A este respecto, los resultados difieren con lo observado por Venkatasubramanian y col. (1986) para la hormona entera. Estos autores informaron que la Tpo se fija con alta afinidad al sitio de la acetilcolina. Sin embargo, posteriormente el mismo grupo demostró que la Tpo interactúa con el sitio de la acetilcolina sólo a altas concentraciones (Revah y col., 1987).

Mediante técnicas de "patch clamp" en la línea celular Cz del ratón, Revah y col. (1987) observaron la aparición, en presencia de TPO, de largos periodos en los cuales el canal permanece cerrado entre grupos de aperturas siendo dicho efecto dependiente de la presencia de Ca^{2+} , el que actuaría sobre la superficie intracelular de la membrana. Mediante estudios

bioquímicos, los mismos autores demostraron que la Tpo ejerce efectos alostéricos positivos dependientes de Ca^{2+} sobre la fijación de [3H]-acetilcolina y [3H]-fenciclidina a sus respectivos sitios. Utilizando técnicas de cinética rápida y un agonista fluorescente, estos autores demostraron que la Tpo, en presencia de Ca^{2+} , acelera la transición al estado desensibilizado de alta afinidad para los agonistas y bloqueantes no competitivos, y modifica el equilibrio entre los estados de baja y de alta afinidad favoreciendo el establecimiento de este último.

La naturaleza del sitio o los sitios a los cuales la Tpo y la Tp5 se fijan para promover la desensibilización del receptor todavía no se conoce. En tal sentido, Revah y col. (1987) consideran que la Tpo no se une al sitio de los bloqueantes no competitivos ya que esta hormona no compite con la fenciclidina por su sitio de unión. Los estudios de fijación de [3H]-acetilcolina (Revah y col., 1987) y de [^{125}I]- α -BuTx (en el presente trabajo) indican que el sitio de fijación de Tpo y Tp5 respectivamente es distinto del sitio de fijación de acetilcolina.

Los resultados aquí presentados sugieren que el sitio activo de la Tpo modifica la función del receptor induciendo el estado desensibilizado en el cual el receptor no responde al agonista. Esto podría explicar los efectos inhibitorios de la hormona y del TP5 sobre la transmisión neuromuscular (Goldstein, 1974; Audhya y col., 1984).

Se han descrito varios posibles efectores fisiológicos de la desensibilización del receptor nicotínico (Changeux y Revah, 1987). Ellos son el Ca^{2+} (Manthey, 1966; Magazanick y Vyskocil, 1970; Sugiyama y col., 1976), la fosforilación del receptor (Huganir y col., 1986) y la timopoyetina (Revah y col., 1987).

Estos acelerarían el proceso de desensibilización y/o estabilizarían el estado desensibilizado del receptor, de alta afinidad para los agonistas.

Los efectos observados de la TPo sobre la unión neuromuscular podrían ser mediados por la hormona entera o por un péptido producido por el clivaje de la misma posiblemente por una peptidasa. En tal sentido, se ha demostrado la presencia en membranas de órgano eléctrico del género Torpedo de actividad enzimática semejante a la enzima convertidora de angiotensina I y la endopeptidasa-24.11 o "encefalinasa" de mamíferos (Altstein y col., 1984; Turner y Dowdall, 1984). Dicha actividad enzimática sugiere la presencia de enzimas en el órgano eléctrico de peces que podrían estar implicadas en la hidrólisis de un péptido endógeno.

Es posible, también, que uno o más péptidos relacionados estructuralmente al TP5 sean liberados por los terminales nerviosos, y actúen sobre el receptor nicotínico acelerando su desensibilización. Michaelson y col. (1984) observaron inmunoreactividad para compuestos semejantes a encefalinas, en el órgano eléctrico de peces del género Torpedo, los que se encuentran, al igual que la acetilcolina, en altas concentraciones en los terminales sinápticos. Estas sustancias, de naturaleza aparentemente peptídica, no parecen ser idénticas a las encefalinas de los mamíferos (Michaelson y col., 1984). De este modo es posible que los terminales sinápticos del órgano eléctrico del género Torpedo contengan un péptido endógeno que podría liberarse junto a la acetilcolina, modulando la respuesta de la membrana postsináptica al neurotransmisor.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el receptor nicotínico del órgano eléctrico de Discopyge tschudii y sus propiedades funcionales en membranas reconstituidas.

En tal sentido se comprobó la existencia de sitios que fijan α -bungarotoxina y de influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ estimulado por carbamilcolina en preparaciones de membranas del órgano eléctrico de D. tschudii. La respuesta fue bloqueada por curare y se inactivó por incubación previa de las membranas con el agonista (desensibilización).

El material fue extraído con colato de sodio y se purificó por cromatografía de afinidad utilizando bromoacetilcolina como ligando. La actividad específica del material purificado fue, en promedio, de 4,7 nmoles de α -bungarotoxina/mg proteína. El análisis de dicho material por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS de dicho material reveló la presencia de cuatro bandas de PM 41.200, 49.500, 60.000 y 66.300.

El receptor purificado fue incorporado a liposomas de lecitina de soja (asolectina). Las propiedades funcionales del receptor se preservaron en las muestras reconstituidas. Esto es: capacidad de fijación de ligandos, influjo de cationes estimulado por carbamilcolina, la desensibilización de la respuesta y las transiciones de afinidad para agonistas que se correlacionan con este último fenómeno.

Se demostrò ademàs, como habia sido observado por mètodos electrofisiològicos en preparaciones neuromusculares y por mètodos bioquímicos en fragmentos de membranas de òrgano elèctrico, que el Ca^{2+} acelera la velocidad de inactivaciòn (desensibilizaciòn) del receptor reconstituido en liposomas.

Estas observaciones sugieren la presencia de un receptor colinèrgico de tipo nicotínico en el òrgano elèctrico de D. tschudii, con características bioquímicas y funcionales similares al receptor de las especies del gènere Torpedo. Esto permite considerar al òrgano elèctrico de D. tschudii como una fuente para el estudio de este receptor.

El receptor nicotínico purificado y reconstituido en liposomas fue el sistema elegido para estudiar el mecanismo de acciòn de la droga amantadina. Esta droga, utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y para prevenir ciertas infecciones virales, produce, ademàs, un bloqueo de la transmisiòn neuromuscular uniéndose al receptor nicotínico en un sitio distinto del sitio de uniòn de la acetilcolina. En el presente trabajo se confirmò que la amantadina es un bloqueante no competitivo del receptor nicotínico ya que no afectò la fijaciòn de α -bungarotoxina en equilibrio pero si produjo un bloqueo del influjo de cationes estimulado por carbamilcolina. A travès de la determinaciòn del influjo de $^{86}\text{Rb}^+$ a membranas expuestas a carbamilcolina por distintos tiempos se observò que la amantadina acelerò la velocidad de inactivaciòn de la respuesta (desensibilizaciòn) inducida por el agonista. La amantadina no indujo dicho fenòmeno por si misma. La aceleraciòn de la velocidad del proceso de desensibilizaciòn seria entònces uno de los mecanismos por los cuales la amantadina ejerce el bloqueo de la

transmisión colinérgica.

Otro de los objetivos del presente trabajo fue estudiar la aplicación de una nueva técnica para la reconstitución del receptor nicotínico y comparar el funcionamiento del receptor en liposomas preparados bajo distintas condiciones experimentales. La técnica empleada fue la de precipitación con polietilenglicol, que ha sido utilizada en la reconstitución del receptor muscarínico del corazón y el receptor α -adrenérgico del cerebro de mamíferos. Se observó que el receptor nicotínico se incorporó a los liposomas y que un 80 % de las moléculas se orientaron correctamente en la membrana. La fijación en equilibrio de α -bungarotoxina reveló que se produjo una pérdida de 50-55% de los sitios durante el procedimiento de reconstitución. Los valores de la constante de velocidad de fijación de α -bungarotoxina de segundo orden (k_T) y de la constante de baja afinidad para carbamilcolina (K_1) fueron comparables a los observados para el receptor reconstituido por el método de diálisis. Sin embargo, el receptor reconstituido por el método de precipitación con PEG exhibió un mínimo influjo de $^{86}Rb^+$ estimulado por carbamilcolina y no manifestó transiciones de afinidad. Cuando la preparación de PEG se purificó, mediante el empleo de éter etílico, para eliminar las impurezas presentes en las muestras comerciales de PEG, el receptor reconstituido exhibió transiciones de afinidad e influjo de cationes estimulado por carbamilcolina. El análisis de los lípidos presentes en las muestras reconstituidas reveló que los proteoliposomas preparados por precipitación con PEG presentaron un contenido mayor de ácidos grasos libres que los preparados por el método de diálisis. Los resultados sugieren que los efectos observados pueden deberse a alguna de las impurezas presentes en las preparaciones de PEG y/o

a la presencia de ácidos grasos libres provenientes, probablemente, de la hidrólisis de la asolectina.

Con el objeto de profundizar en el estudio del fenómeno de la desensibilización del receptor nicotínico, se estudió el efecto de un pentapéptido, denominado timopentina, sobre las propiedades funcionales del receptor nicotínico reconstituido en liposomas. Se piensa que dicho pentapéptido corresponde al sitio activo de la hormona tímica timopoyetina. La timopoyetina y la timopentina, además de sus efectos inmunológicos, producen un bloqueo de la transmisión neuromuscular. En el presente trabajo se muestra que la timopentina no modificó la fijación en equilibrio de α -bungarotoxina pero produjo un bloqueo de la respuesta del receptor en un rango de 10^{-10} M a 10^{-4} M. Más aún se observó que la timopentina aumentó la velocidad de desensibilización del receptor y que dicho fenómeno se incrementó en presencia de Ca^{2+} . Estas observaciones corroboran el efecto que sobre la transmisión neuromuscular tiene la timopoyetina y sugieren que la timopentina o péptidos relacionados podrían modular dicha transmisión.

Solma Redas

ELM Ochoa

REFERENCIAS

ADAMS F.R. (1977). Voltaje jump analysis of procaine action at frog end-plate. *J. Physiol.* 268: 291-318.

AGUILAR J.S. y OCHOA E.L.M. (1986). The heterogeneity and nucleotide modulation of cholinergic muscarinic receptors are restored by poly(ethylene)glycol-6000 precipitation of solubilized atrial receptors. *Neurochem. Int.* 8: 47-51.

AGUILAR J.S., OCHOA E.L.M. Y DE ROBERTIS E. (1987). Reconstitution of solubilized atrial cholinergic muscarinic receptors into liposomes. *Neurochem. Res.* 12: 83-91.

ALBUQUERQUE E.X., ELDEFRAWI A.T., ELDEFRAWI M.E., MANSOUR N.A. y TSAI M-C. (1978). Amantadine: neuromuscular blockade by suppression of ionic conductance of the acetylcholine receptor. *Science* 199: 788-790.

ALTSTEIN M., DUDAI Y. y VOGEL Z. (1984). Enkephalin degrading enzymes are present in the electric organ of *Torpedo californica*. *FEBS Lett.* 166: 183-188.

ANDREASEN T.J. Y MCNAMEE M.G. (1980). Inhibition of ion permeability control properties of acetylcholine receptor from *Torpedo californica* by long-chain fatty acids. *Biochemistry* 19: 4719-4726.

ANHOLT R., LINDSTROM J. Y MONTAL M. (1981). Stabilization of acetylcholine receptor channels by lipids in cholate solution and during reconstitution in vesicles. *J. Biol. Chem.* 256: 4377-4387.

ANHOLT R., FREDKIN D.R., DEERINCK T., ELLISMAN M., MONTAL M. Y LINDSTROM J. (1982). Incorporation of acetylcholine receptors into liposomes. *J. Biol. Chem.* 257: 7122-7134.

AOSHIMA H., CASH D.J. y HESS G.P. (1980). Acetylcholine receptor-controlled ion flux in electroplax membrane vesicles: a minimal mechanism based on rate measurements in the millisecond to minute time region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 896-904.

AOSHIMA H., CASH D.J. y HESS G.P. (1981). Mechanism of inactivation (desensitization) of acetylcholine receptor. Investigations by fast reaction techniques with membrane vesicles. *Biochemistry* 20: 3467-3474.

ARNOLD K., FRATSCH L. Y GAWRISCH K. (1983). Effect of poly(ethylene glycol) on phospholipid hydration and polarity of the external phase. *Biochim. Biophys. Acta* 728: 121-128.

ARONSTAM R.S., ELDEFRAWI A.T., PESSAH I.N., DALY J.W., ALBUQUERQUE E.X. y ELDEFRAWI M.E. (1981). Regulation of [³H]-perhydrohistrionicotoxin binding to *Torpedo ocellata* electroplax by effectors of the acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 256:

2843-2850.

ATHA D.H. E INGHAM K.C. (1981). Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. *J. Biol. Chem.* 256: 12108-12117.

AUDHYA T., SCHLESINGER D.H. Y GOLDSTEIN G. (1981). Complete amino acid sequences of bovine thymopoietins I, II and III: closely homologous polypeptides. *Biochemistry* 20: 6195-6200.

AUDHYA T., SCHEID M.F. Y GOLSTEIN G. (1984). Contrasting biological activities of thymopoietin and splenin, two closely related polypeptide products of thymus and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 2847-2849.

BANGHAM A.D., STANDISH M.M. Y WATKINS J.C. (1965). Diffusion of univalent ion across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13: 238-252.

BARRANTES F.S. (1983). Recent developments in the structure and function of the acetylcholine receptor. *Int. Rev. Neurobiol.* 24: 259-341.

BASCH R.S. Y GOLDSTEIN G. (1974). Induction of T-cell differentiation *in vitro* by thymin, a purified polypeptide hormone of the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 1474-1478.

BASCH R.S. Y GOLDSTEIN G. (1975). Antigenic and functional evidence for the *in vitro* inductive activity of thymopoietin (thymin) on thymocyte precursors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 249: 290-299.

BENNET M.V.L. (1970). Comparative physiology: electric organs. *Ann. Rev. Physiol.* 32: 471-528.

BISHOP D.W., BROWN F.A. Jr., JAHN T.L., PROSSER C.L. Y WULFF V.J. (1950). Electric organs. En: *Comparative Animal Physiology* (editado por Prosser C.L.), pág. 617-619. W.B. Saunders Company, Philadelphia and London.

BLANCHARD S.G., QUAST U., REED K., LEE T., SCHIMERLIK M.I., VANDLEN R., CLAUDIO T., STRADER C.D., MOORE H.-F.H. y RAFTERY M.A. (1979). Interaction of [¹²⁵I]- α -bungarotoxin with acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 18: 1875-1883.

BLOW A.M.J., BOTHAM G.M., FISHER D., GOODALL A.H., TILCOCK C.P.S. Y LUCY J.A. (1978). Water and calcium ions in cell fusion induced by poly(ethylene glycol). *FEBS Lett.* 94: 305-310.

BOHEIM G., HANKE H., BARRANTES F.J., HANSJORG E., SACKMANN B., FELS G. Y MAELICKE A. (1981). Agonist-activated ionic channels in acetylcholine receptor reconstituted into planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3586-3590.

BONI L.T., STEWART T.P., ALDERFER J.L. Y HUI S.W. (1981). Lipid-polyethylene glycol interactions: I. Induction of fusion between liposomes. *J. Mem. Biol.* 62: 65-70.

BURGERMEISTER W., CATTERALL W.A. Y WITKOP B. (1977). Histriocotoxin enhances agonist-induced desensitization of acetylcholine receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5754-5758.

CASH D.J. y HESS G.P. (1980). Molecular mechanism of acetylcholine receptor-controlled ion translocation across cell membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 842-846.

CHANGEUX J.-P., KASAI M. y LEE C.Y. (1970). Use of snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67: 1241-1247.

CHANGEUX J.-P. (1981). The acetylcholine receptor: an allosteric membrane protein. En: The Harvey Lectures, vol. 75, pág. 85-254. Academic Press, New York.

CHANGEUX J.-P. , DEVILLERS-THIERY A. y CHEMOUILLI P. (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. Science 225: 1335-1345.

CHANGEUX J.-P. y REVAH F. (1987). The acetylcholine receptor molecule: allosteric sites and the ion channel. TINS 10: 245-250.

CHICHEPORTICHE R., VINCENT J.-P., KOPEYAN C., SCHWEITZ H. y LAZDUNSKI M. (1975). Structure-function relationship in the binding of snake neurotoxins to the Torpedo membrane receptor. Biochemistry 14: 2081-2091.

CHOTHIA C. (1970). Interaction of acetylcholine with different cholinergic nerve receptors. Nature 225: 36-38.

CLAUDIO T., BALLIVET M., PATRICK J. y HEINEMANN S. (1983). Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor γ subunit. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 1111-1115.

COHEN J.B., WEBER M. y CHANGEUX J.-P. (1974). Effects of local anesthetics and calcium on the interaction of cholinergic ligands with the nicotinic receptor protein from Torpedo marmorata. Mol. Pharmacol. 10: 904-932.

CONTI-TRONCONI B.M. y RAFTERY M.A. (1982). The nicotinic cholinergic receptor: correlation of molecular structure with functional properties. Ann. Rev. Biochem. 51: 491-530.

COVARRUBIAS M., PRINZ H., MEYERS H.-W y MAELICKE A. (1986). Equilibrium binding of cholinergic ligands to the membrane-bound acetylcholine receptor. J. Biol. Chem. 261: 14955-14964.

COX R.N., KALDANY R.-R.J., DIPAOLO M. y KARLIN A. (1985). Time-resolved photolabeling by quinacrine azide of a noncompetitive inhibitor site of the nicotinic acetylcholine receptor in a transient, agonist-induced state. J. Biol. Chem. 260: 7186-7193.

CRIADO M., EIBL H. Y BARRANTES F.J. (1984). Functional

properties of the acetylcholine receptor incorporated in model lipid membranes. *J. Biol. Chem.* 259: 9188-9198.

DALE H.H. (1914). The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 6: 147-190.

DALE H.H., FELDBERG W. Y VOGT M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol.* 86: 353-380.

DALZIEL A.W., ROLLINS E.S. Y MCNAMEE M.G. (1980). The effect of cholesterol on agonist-induced flux in reconstituted acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* 122: 193-196.

DAMLE V.N., MCLAUGHLIN M. Y KARLIN A. (1978). Bromoacetylcholine as an affinity label of the acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 845-851.

DAVIES W.L., GRUNERT R.R., HAFF R.F., MCGAHEN J.W., NEUMAYER E.M., PAULSHOCK M., WATTS J.C., WOOD T.R., HERMANN E.C. Y HOFFMANN C.E. (1964). Antiviral activity of 1-adamantanamine (Amantadine). *Science* 144: 862-863.

DEL CASTILLO J. Y KATZ B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol.* 124: 560-573.

DELEGEANE A.M. Y MCNAMEE M.G. (1980). Independent activation of the acetylcholine receptor from *Torpedo californica* at two sites. *Biochemistry* 19: 890-895.

DEVILLERS-THIERY A., GIRAUDAT J., BENTABOULET M. Y CHANGEUX J.-P. (1983). Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding α -subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2067-2071.

EARNEST J.P., WANG H.H. Y MCNAMEE M.G. (1984). Multiple binding sites for local anesthetics on reconstituted acetylcholine receptor membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 862-868.

ELDEFRAWI A.T., ELDEFRAWI M.E., ALBUQUERQUE E.X., OLIVEIRA A.C., MANSOUR N., ADLER M., DALY J.W., BROWN G.B., BURGERMEISTER W. Y WITKOP B. (1977). Perhydrohistrionicotoxin: a potential ligand for the ion conductance modulator of the acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 2172-2176.

ELDEFRAWI M.E., ELDEFRAWI A.T., MANSOUR N.A., DALY J.W., WITKOP B. Y ALBUQUERQUE E.X. (1978). Acetylcholine receptor and ionic channel of *Torpedo* electroplax: binding of perhydrohistrionicotoxin to membrane and solubilized preparations. *Biochemistry* 17: 5474-5484.

ELDEFRAWI M.E., ARONSTAM R.S., BAKRY N.M., ELDEFRAWI A.T. Y ALBUQUERQUE E.X. (1980 a). Activation, inactivation, and desensitization of acetylcholine receptor channel complex detected

by binding of perhydrohistrionicotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 2309-2313.

ELDEFRAWI M.E., ELDEFRAWI A.T., ARONSTAM R.S., MALEQUE M.A., WARNICK J.E. Y ALBUQUERQUE E.X. (1980b). [³H]-Phencyclidine: a probe for the ionic channel of the nicotinic receptor. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 7458-7462.

ELDEFRAWI A.T., MILLER E.R., MURPHY D.L. Y ELDEFRAWI M.E. (1982). ³H Phencyclidine interactions with the nicotinic acetylcholine receptor channel and its inhibition by psychotropic, antipsychotic, opiate, antidepressant, antibiotic, antiviral, and antiarrhythmic drugs. Mol. Pharmacol. 22: 72-81.

ELLIOT J. Y RAFTERY M.A. (1977). Interactions of perhydrohistrionicotoxin with postsynaptic membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77: 1347-1353.

ELLIOT J. AND RAFTERY M.A. (1979). Binding of perhydrohistrionicotoxin to intact and detergent solubilized membranes enriched in nicotinic acetylcholine receptor. Biochemistry 18: 1868-1874.

ELLMANN G.L., COURTNEY K.D., ANDRES V. Y FEATHERSTONE R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7: 88-95.

EPSTEIN M. Y RACKER E. (1978). Reconstitution of carbamylcholine-dependent sodium ion flux and desensitization of the acetylcholine receptor from Torpedo californica. J. Biol. Chem. 253: 6660-6662.

EULER U.S. von (1946). The presence of a substance with sympathin E properties in spleen extracts. Acta Physiol. Scand. 11: 168-186.

FERTUCK H.C. Y SALPETER M.M. (1974). Localization of acetylcholine receptor by [¹²⁵I]-labeled α -bungarotoxin binding at mouse motor end-plates. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 1376-1378.

FONG T.M. Y MCNAMEE M.G. (1986). Correlation between acetylcholine receptor function and structural properties of membranes. Biochemistry 25: 830-840.

GAGE F.W. (1976). Generation of end-plate potentials. Physiol Rev. 56: 177-247.

GASKO D.D., KNOWLES A.F., SHERTZER H.G., SUOLINNA E.-M. Y RACKER E. (1976). The use of ion-exchange resins for studying ion transport in biological systems. Anal. Biochem. 72: 57-65.

GIRAUDAT J., DENNIS M., HEIDMANN T., CHANG J-Y Y CHANGEUX J.-P. (1986). Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: serine-262 of the δ subunit is labeled by ³H chlorpromazine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 2719-2723.

GOLDSTEIN G. (1968). The thymus and neuromuscular function. A substance in thymus which causes myositis and myasthenic neuromuscular block in guinea pigs. *The Lancet* ii: 119-122.

GOLDSTEIN G. Y MANGANARO A. (1971). Thymin: a thymic polypeptide causing the neuromuscular block of Myasthenia Gravis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 18: 230-240.

GOLDSTEIN G. (1974). Isolation of Bovine Thymin: a polypeptide hormone of the thymus. *Nature* 247: 11-14.

GOLDSTEIN G., SCHEID M.P., BOYSE E.A., SCHLESINGER D.H. Y WAUWE J.V. (1979). A synthetic pentapeptide with biological activity characteristic of the thymic hormone thymopoietin. *Science* 204: 1309-1310.

GRELAK R.P., CLARK R., STUMP J.M. Y VERNIER V.G. (1970). Amantadine-dopamine interaction: possible mode of action in Parkinsonism. *Science* 169: 203-204.

GRUNDFEST H. (1960). Electric fishes. *Scientific American* 203(4): 115-124.

GRUNHAGEN H.-H. Y CHANGEUX J.-P. (1976). Studies on the electrogenic action of acetylcholine with Torpedo marmorata electric organ. IV. Quinacrine: a fluorescent probe for the conformational transition of the cholinergic receptor protein in its membrane-bound state. *J. Mol. Biol.* 106: 497-516.

GUY H.R. Y HUCHO F. (1987). The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor. *TINS* 10: 318-321.

HAMBURGER R., AZAZ E. Y DONBROW M. (1975). Autoxidation of polyoxyethylene non-ionic surfactants and of polyethylene glycols. *Pharm. Acta Helv.* 50: 10-17.

HAMILTON S.L., MCLAUGHLIN M. Y KARLIN A. (1977). Disulfide bond cross-linked dimer in acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 692-699.

HAMILTON S.L., MCLAUGHLIN M. Y KARLIN A. (1979). Formation of disulfide-linked oligomers of acetylcholine receptor in membrane from Torpedo electric tissue. *Biochemistry* 18: 155-163.

HARDEN T.K., TANNER L.I., MARTIN M.W., NAKAHATA N., HUGHES A.R., HEPLER J.R., EVANS T., MASTERS S.B. Y BROWN J.H. (1986). Characteristics of two biochemical responses to stimulation of muscarinic cholinergic receptors. *TIPS* Feb. 1986 Suppl.: 14-18.

HARTIG P.R. Y RAFTERY M.A. (1979). Preparation of right-side-out, acetylcholine receptor enriched intact vesicles from Torpedo californica electroplaque membranes. *Biochemistry* 18: 1146-1150.

HEIDMANN T. Y CHANGEUX J.-P. (1979). Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. *Eur. J. Biochem.* 94: 281-296.

HEIDMANN T. Y CHANGEUX J.-P (1980). Interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from Torpedo marmorata in the millisecond time range: resolution of an "intermediate" conformational transition and evidence for positive cooperative effects. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97: 889-896.

HEIDMANN T., BERNHARDT J., NEUMANN E. Y CHANGEUX J.-P. (1983 a). Rapid kinetics of agonist binding and permeability response analysed in parallel on acetylcholine receptor rich membranes from Torpedo marmorata. Biochemistry 22: 5452-5459.

HEIDMANN T., OSWALD R.E. Y CHANGEUX J.-P. (1983 b). Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor rich membrane fragments from Torpedo marmorata. Biochemistry 22: 3112-3127.

HESS G.P., CASH D.J. Y AOSHIMA H. (1979). Acetylcholine receptor-controlled ion fluxes in membrane vesicles investigated by fast reaction techniques. Nature 282: 329-331.

HESS G.P., CASH D.J. Y AOSHIMA H. (1980). Kinetic mechanism of acetylcholine receptor-controlled ion flux: flow quench kinetic measurements of acetylcholine-induced flux in membrane vesicles. Neurochem. Int. 2: 233-242.

HESS G.P., AOSHIMA H., CASH D.J. Y LENCHITZ B. (1981). Specific reaction rate of acetylcholine receptor-controlled ion translocation: a comparison of measurements with membrane vesicles and with muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1361-1365.

HESS G.P., PASQUALE E.B., WALKER J.W. Y MCNAMEE M.G. (1982). Comparison of acetylcholine receptor-controlled cation flux in membrane vesicles from Torpedo californica and Electrophorus electricus: chemical kinetic measurements in the millisecond region. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 963-967.

HESS H.H. Y LEWIN E. (1965). Microassay of biochemical structural components in nervous tissues. II. Methods for cerebroside, propeolipid proteins and residue proteins. J. Neurochem. 12: 205-211.

HONDA K., MAEDA Y., SASAKAWA S., OHNO H. Y TSUCHIDA E. (1981). The components contained in polyethylene glycol of commercial grade (PEG-6000) as cell fusogen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 101: 165-171.

HUGANIR R.L., SCHELL M.A. Y RACKER E. (1979). Reconstitution of the purified acetylcholine receptor from Torpedo californica. FEBS Lett 108: 155-160.

HUGANIR R.L. Y RACKER E. (1982). Properties of proteoliposomes reconstituted with acetylcholine receptor from Torpedo californica. J. Biol. Chem. 257: 9372-9378.

HUGANIR R.L., DELCOUR A.H., GREENGARD P. AND HESS G.P. (1986).

Phosphorilation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* 321: 774-776.

IRALDI C., OCHOA E.L.M. Y PELLEGRINO DE IRALDI A. (1984). Ultrastructure of the electroplaque in Discopyge tschudii: membranous components. *Comun. Biol.* 2: 293-301.

KALDANY R.-R.J. Y KARLIN A. (1983). Reaction of quinacrine mustard with the acetylcholine receptor from Torpedo californica. *J. Biol. Chem.* 258: 6232-6242.

KARPEN J.W., AOSHIMA H., ABOOD L.G. Y HESS G.P. (1982). Cocaine and phencyclidine inhibition of the acetylcholine receptor: analysis of the mechanisms of action based on measurements of ion flux in the millisecond-to-minute time region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 2509-2513.

KAO F.N., DWORAK A.J., KALDANY R.-R.J., SILVER M.L., WIDEMAN J., STEIN S. Y KARLIN A. (1984). Identification of the α -subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J. Biol. Chem.* 259: 11662-11665.

KARLIN A. Y BARTELS E. (1966). Effects of blocking sulphydryl groups and of reducing disulfide bonds on the acetylcholine-activated permeability system of the electroplax. *Biochim. Biophys. Acta* 126: 525-535.

KARLIN A. Y COWBURN D. (1973). The affinity-labeling of partially purified acetylcholine receptor from electric tissue of Electrophorus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3636-3640.

KARLIN A. (1980). Molecular properties of nicotinic acetylcholine receptors. En: *The Cell Surface and Neuronal Function* (editado por Cotman C.W., Poste G. y Nicolson G.L.), p&g. 191-260. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

KARLIN A. (1983). The anatomy of a receptor. *Neuroscience Commentaries* 1: 111-123.

KARLIN A., KAO F.N. Y DIFAOLA M. (1986). Molecular pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor. *TIPS* (agosto 1986): 304-308.

KATO G. Y CHANGEUX J.-P. (1976). Studies on the effect of histrionicotoxin on the monocellular electroplax from Electrophorus electricus and on the binding of [3 H]-acetylcholine. *Mol. Pharmacol.* 12: 92-100.

KATZ B. Y THESLEFF S. (1957). A study of the "desensitization" produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* 138: 63-80.

KATZ B. Y MILEDI R. (1975). The effect of procaine on the action of acetylcholine at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 249: 269-284.

KLEIN R.L., LAGERCRANTZ H. Y ZIMMERMANN H. (1982). Chemical Neurotransmission. An Introduction. En: Neurotransmitter Vesicles (editado por Klein R.L., Lagercrantz H. y Zimmermann H.), pàg. 1-27. Academic Press Inc., London.

KLOOG Y., KALIR A., BUCHMAN O. Y SOKOLOVSKY M. (1980). Specific binding of [3 H]-phencyclidines to membrane preparation. FEBS Lett. 109: 125-128.

KOBLIN D.D. Y LESTER H.A. (1979). Voltage-dependent and voltage-independent blockade of acetylcholine receptors by local anesthetics in Electrophorus electroplaques. Mol. Pharmacol. 15: 559-580.

KOMURO K., GOLDSTEIN G. Y BOYSE E.A. (1975). Thymus-repopulating capacity of cells that can be induced to differentiate to T cells in vitro. J. Immunol. 115: 195-198.

KREMENETZKY R. Y ATLAS D. (1984). Solubilization and reconstitution of α_2 -adrenergic receptors from rat and calf brain. Eur. J. Biochem. 138: 573-577.

KRODEL E.K., BECKMAN R.A. Y COHEN J.B. (1979). Identification of a local anesthetic binding site in nicotinic postsynaptic membranes isolated from Torpedo marmorata electric tissue. Mol. Pharmacol. 15: 294-312.

KUFFLER S.W. Y YOSHIKAMI D. (1975). The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. J. Physiol. 251: 465-482.

KUFFLER S.W. Y NICHOLLS J.G. (1982 a). Transmisión sinàptica. En: De la neurona al cerebro, pàg. 147-178. Editorial Revertè. Barcelona. España.

KUFFLER S.W. Y NICHOLLS J.G. (1982 b). Microfisiologia de la transmissió química. En: De la neurona al cerebro, pàg. 195-221. Editorial Revertè. Barcelona. España.

LEE C.Y., CHANG S.L., KAU S.T. Y LUH S.H. (1972). Chromatographic separation of the venom of Bungarus multicinctus and characterization of its components. J. Chromatog. 72: 71-82.

LEE C.Y. (1979). Recent advances in chemistry and pharmacology of snake toxins. En: Advances in Cytopharmacology, Vol. 3, pàg. 1-16 (editado por Ceccarelli B. y Clementi). Raven Press, New York.

LETTERS R. (1964). The application of a two-dimensional paper chromatographic technique to the analysis of phospholipids. Biochem. J. 93: 313-316.

LEVITZKI A. (1986). Bacterial adaptation, visual adaptation, receptor desensitization- a common link? TIPS (Enero 1986): 3-6.

LINDSTROM J. (1979). Autoimmune response to acetylcholine

receptors in Myasthenia Gravis and its animal model. *Adv. Immunology* 27: 1-50.

LINDSTROM J., MERLIE J. Y YOGESWARAN G. (1979). Biochemical properties of acetylcholine receptor subunits from Torpedo californica. *Biochemistry* 18: 4465-4470.

LINDSTROM J., ANHOLT R., EINARSON B., ENGEL A., OSAME M. Y MONTAL M. (1980). Purification of acetylcholine receptors, reconstitution into lipid vesicles, and study of agonist-induced cation channel regulation. *J. Biol. Chem.* 255: 8340-8350.

LITTER M. (1975 a). Agentes colinérgicos o parasimpaticomiméticos. En: *Farmacología Experimental y Clínica*. 5ª Edición, pág. 552-576. Editorial El Ateneo, Buenos Aires.

LITTER M. (1975 b). Quimioterapia de la sífilis, micosis y virosis. En: *Farmacología Experimental y Clínica*. 5ª Edición, pág. 1719-1746. Editorial Ateneo, Buenos Aires.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. Y RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

MAELICKE A., FULPIUS B.W., KLETT R.F. Y REICH E. (1977). Acetylcholine receptor. Responses to drug binding. *J. Biol. Chem.* 252: 4811-4830.

MAELICKE A. Y FRINZ H. (1983). The acetylcholine receptor-ion channel complex: linkage between binding and response. *Mod. Cell Biol.* 1: 171-197.

MAGAZANIK L.G. Y VYSKOCIL F. (1970). Dependence of acetylcholine desensitization on the membrane potential of frog muscle fibre and on the ionic changes in the medium. *J. Physiol.* 210: 507-518.

MANTHEY A.A. (1966). The effect of calcium on the desensitization of membrane receptors at the neuromuscular junction. *J. Gen. Physiol.* 49: 963-976.

MCNAMEE M.G., WEILL C.L. Y KARLIN A. (1975). Purification of acetylcholine receptor from Torpedo californica and its incorporation into phospholipid vesicles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 264: 175-182.

MCNAMEE M.G. Y OCHOA E.L.M. (1982). Reconstitution of acetylcholine receptor function in model membranes. *Neuroscience* 7: 2305-2319.

MCNAMEE M.G., JONES O.T. Y FONG T.M. (1986). Function of acetylcholine receptors in reconstituted liposomes. En: *Ion Channel Reconstitution* (editado por Miller C.), pág. 231- 273. Plenum Press.

MENDEZ B., GARRIDO J., MALDONADO M., JAKSIC F.M. E INESTROSA N.C. (1984). The electric organ of Discopyge tschudii: its

innervated face and the biology of acetylcholinesterase. *Cel. Mol. Neurobiol.* 4: 125-142.

MENNI R.C., RINGUELET R.A. Y ARAMBURU R.H. (1984). Clave para la determinación de familias y géneros de peces marinos de la Argentina y Uruguay. En: *Peces marinos de la Argentina y Uruguay*, pág. 21-59. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. Argentina.

MICHAELSON D.M., MCDOWALL G. Y SARNE Y. (1984). The Torpedo electric organ is a model for opiate regulation of acetylcholine release. *Brain Res.* 305: 173-176.

MILEDI R., MOLINOFF P. Y POTTER L.T. (1971). Isolation of the cholinergic receptor protein of Torpedo electric tissue. *Nature* 229: 554-557.

MILLER C. Y RACKER E. (1979). Reconstitution of membrane transport functions. En: *The Receptors*, vol. 1 (editado por O'Brien R.D.), pág. 1-31. Plenum Press. New York. London.

MILLER J.V., LUKAS R.J. Y BENNET E.L. (1979). Effects of thiol modification and Ca^{++} on agonist-specific state transitions of nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica electroplax. *Life Sci.* 24: 1893-1900.

MONOD J., WYMAN J. Y CHANGEUX J.-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12: 88-118.

NACHMANSOHN D. (1959). Sequence of energy transformations. En: *Chemical and molecular basis of nerve activity*, pág. 69-99. Academic Press Inc. New York and London.

NASTUK W.L., SU P.C. Y DOUBILET P. (1976). Anticholinergic and membrane activities of amantadine in neuromuscular transmission. *Nature* 264: 76-79.

NEHER E. Y STEINBACH H. (1978). Local anesthetics transiently block currents through single acetylcholine channels. *J. Physiol.* 277: 153-176.

NEUBIG R.R. Y COHEN J.B. (1979). Equilibrium binding of 3H tubocurarine and 3H acetylcholine by Torpedo postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions. *Biochemistry* 18: 5464-5475.

NEUBIG R., KRODEL E.K., BOYD N.D. Y COHEN J.B. (1979). Acetylcholine and local anesthetic binding to Torpedo nicotinic postsynaptic membranes after removal of nonreceptor peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 690-694.

NEUBIG R. Y COHEN J.B. (1980). Permeability control by cholinergic receptors in Torpedo postsynaptic membranes: agonist dose-response relations measured at second and millisecond times. *Biochemistry* 19: 2770-2779.

NEUBIG R.R., BOYD N.D. Y COHEN J.B. (1982). Conformations of

Torpedo acetylcholine receptor associated with ion transport and desensitization. *Biochemistry* 21: 3460-3467.

NEUMANN D., BARCHAN D., SAFRAN A., GERSHONI J.M. Y FUCHS S. (1986). Mapping of the α -bungarotoxin binding site within the α subunit of the acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 3008-3011.

NODA M., TAKAHASHI H., TANABE T., TOYOSATO M., FURUTANI Y., HIROSE T., ASAI M., INAYAMA S., MIYATA T. Y NUMA S. (1982). Primary structure of α -subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299: 793-797.

NODA M., TAKAHASHI H., TANABE T., TOYOSATO M., KIKYOTANI S., HIROSE T., ASAI M., TAKASHIMA H., INAYAMA S., MIYATA T. Y NUMA S. (1983 a). Primary structures of β - and δ -subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 301: 251-255.

NODA M., TAKAHASHI H., TANABE T., TOYOSATO M., KIKYOTANI S., FURUTANI Y., HIROSE T., TAKASHIMA H., INAYAMA S., MIYATA T. Y NUMA S. (1983 b). Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302: 528-532.

NORMAN J.R. (1937). Coast fishes. Part II. The Patagonian region. En: *Discovery Reports*, vol. 16, pág. 3-152. Cambridge at the University Press.

OCHOA E.L.M. (1978). Reconstitution of acetylcholinesterase activity from electroplax membrane fragments into phosphatidylcholine vesicles. *FEBS Lett.* 89: 317-320.

OCHOA E.L.M. (1980 a). The incorporation of acetylcholinesterase from the electric organ into liposomes. *Eur. J. Biochem.* 107: 415-421.

OCHOA E.L.M. (1980 b). Discopyge tschudii electric organ acetylcholinesterase: extraction and demonstration of multiple molecular forms. *Comp. Biochem. Physiol.* 66 C: 99-103.

OCHOA E.L.M. (1983). The effects of amantadine on liposomally reconstituted nicotinic acetylcholine receptor. *Neurochem. Int.* 5: 339-343.

OCHOA E.L.M., DALZIEL A.W. Y MCNAMEE M.G. (1983). Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition. *Biochim. Biophys. Acta* 727: 151-162.

OSWALD R. Y CHANGEUX J.-F. (1981 a). Ultraviolet light-induced labeling by noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor from Torpedo marmorata. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3925-3929.

OSWALD R.E. Y CHANGEUX J.-F. (1981 b). Selective labeling of the δ subunit of the acetylcholine receptor by a covalent local

anesthetic. *Biochemistry* 20: 7166-7174.

OSWALD R.E., HEIDMANN T. Y CHANGEUX J.-P. (1983). Multiple affinity states for noncompetitive blockers revealed by [³H]-phencyclidine binding to acetylcholine receptor rich membrane fragments from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry* 22: 3128-3136.

PALFREY C. Y LITTAUER U.Z. (1976). Sodium-dependent efflux of potassium (1+) and rubidium (1+) through the activated sodium channel of neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 209-215.

PARASCANDOLA J. (1981). Origins of the receptor theory. En: *Towards Understanding Receptors. Current Reviews in Biomedicine 1* (editado por Lambie J.W.), pàg. 1-7. Elsevier/North Holland.

PELLEGRINO DE IRALDI A., AGUILAR J.S. Y OCHOA E.L.M. (1986). Ultrastructure of reconstituted membranes containing the muscarinic receptor. *Neurochem. Res.* 11: 983-996.

PICK U. (1981). Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 186-194.

POPOT J.-L., CARTAUD J. Y CHANGEUX J.-P. (1981). Reconstitution of a functional acetylcholine receptor. Incorporation into artificial lipid vesicles and pharmacology of the agonist-controlled permeability changes. *Eur. J. Biochem.* 118: 203-214.

POTTER L.T. (1974). α -Bungarotoxin (and similar neurotoxins) and nicotinic acetylcholine receptors. Editado por Fleischer S. y Packer L. *Methods in Enzymology* 32 B: 309-323. Academic Press, Inc.

QUAST U., SCHIMERLIK M., LEE T., WITZEMANN V., BLANCHARD S. Y RAFTERY M.A. (1978). Ligand-induced conformation changes in *Torpedo californica* membrane-bound acetylcholine receptor. *Biochemistry* 17: 2405-2414.

RAFTERY M.A., HUNKAPILLER M.W., STRADER C.D. Y HOOD L.E. (1980). Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208: 1454-1456.

REED K., VANDLEN R., BODL J., DUGUID J. Y RAFTERY M.A. (1975). Characterization of acetylcholine receptor-rich and acetylcholinesterase-rich membrane particles from *Torpedo californica* electroplax. *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 138-144.

REVAH F., MULLE C., FINSET C., AUDHYA T., GOLDSTEIN G. Y CHANGEUX J.-P. (1987). Calcium-dependent effects of the thymic polypeptide thymopoietin on the desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 3477-3481.

REYNOLDS J. Y KARLIN A. (1978) Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*.

Biochemistry 17: 2035-2038.

ROSENBERY T.L. (1975). Acetylcholinesterase. En: Advances in Enzymology, vol. 43 (editado por Meister A., Wiley J. & Sons), pág. 103-218.

SAEZ R., ALONSO A., VILLENA A. Y GONI F.M. (1982). Detergent-like properties of polyethylene glycols in relation to model membranes. FEBS Lett. 137: 323-326.

SCHEID M.P., GOLDSTEIN G. Y BOYSE E.A. (1975). Differentiation of T cells in nude mice. Science 190: 1211-1213.

SCHEID M.P., GOLDSTEIN G. Y BOYSE E.A. (1978). The generation and regulation of lymphocyte populations. Evidence from differentiative induction systems in vitro. J. Exp. Med. 147: 1727-1743.

SCHINDLER H. Y QUAST U. (1980). Functional acetylcholine receptor from Torpedo marmorata in planar membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3052-3056.

SCHLEGEL R., DICKSON R.B., WILLINGHAM M.C. Y PASTAN I.H. (1982). Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of α -macroglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A 79: 2291-2295.

SCHLESINGER D.H. Y GOLDSTEIN G. (1975). The amino acid sequence of thymopoietin II. Cell 5: 361-365.

SCHLESINGER D.H., GOLDSTEIN G., SCHEID M.P. Y BOYSE E.A. (1975). Chemical synthesis of a peptide fragment of thymopoietin II that induces selective T cell differentiation. Cell 5: 367-370.

SCHMIDT J. Y RAFTERY M.A. (1973). A simple assay for the study of solubilized acetylcholine receptors. Anal. Biochem. 52: 349-354.

SHERIDAN M.N. (1965). The fine structure of the electric organ of Torpedo marmorata. J. Cell Biol. 24: 129-141.

SINE S.M. Y TAYLOR P. (1982). Local anesthetics and histrionicotoxin are allosteric inhibitors of the acetylcholine receptor. J. Biol. Chem. 257: 8106-8114.

SOBEL A., WEBER M. Y CHANGEUX J.-P. (1977). Large-scale purification of the acetylcholine-receptor protein in its membrane-bound and detergent-extracted forms from Torpedo marmorata electric organ. Eur. J. Biochem. 80: 215-224.

SOBEL A., HEIDMANN T., HOFER J. Y CHANGEUX J.-P. (1978). Distinct protein components from Torpedo marmorata membranes carry the acetylcholine receptor site and the binding site for local anesthetics and histrionicotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 510-514.

SOBEL A., HEIDMANN T., CARTAUD J. Y CHANGEUX J.-P. (1980).

Reconstitution of a functional acetylcholine receptor. Polypeptide chains, ultrastructure, and binding sites for acetylcholine and local anesthetics. *Eur. J. Biochem.* 110: 13-33.

STROUD R.M. Y FINER-MOORE J. (1985). Acetylcholine receptor structure, function, and evolution. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1: 317-351.

SUGIYAMA H., POPOT J.-L. Y CHANGEUX J.-F. (1976). Studies on the electrogenic action of acetylcholine with Torpedo marmorata electric organ. III. Pharmacological desensitization "in vitro" of the receptor-rich membrane fragments by cholinergic agonists. *J. Mol. Biol.* 106: 485-496.

SUNSHINE G.H., BASCH R.S., COFFEY R.G., COHEN K.W., GOLDSTEIN G. Y HADDEN J.W. (1978). Thymopoietin enhances the allogenic response and cyclic GMP levels of mouse peripheral, thymus-derived lymphocytes. *J. Immunol.* 120: 1594-1599.

TAKENAKA T., HORIE H. Y HORI H. (1987). Effects of fatty acids on membrane currents in the squid giant axon. *J. Memb. Biol.* 95: 113-120.

TILCOCK C.P.S. Y FISHER D. (1982). The interaction of phospholipid membranes with poly(ethylene glycol) vesicle aggregation and lipid exchange. *Biochim. Biophys. Acta* 688: 645-652.

TRIGGLE D.J. (1981). Desensitization. En: *Towards Understanding Receptors. Current Reviews in Biomedicine 1* (editado por Lambie J.W.), pàg. 28-33. Elsevier/North-Holland Biomedical. Amsterdam. New York. Oxford Press.

TSAI M.-C., MANSOUR N.A., ELDEFRAWI A.T., ELDEFRAWI M.E. Y ALBUQUERQUE E.X. (1978). Mechanism of action of amantadine on neuromuscular transmission. *Mol. Pharmacol.* 14: 787-803.

TURNER A.J. Y DOWDALL M.J. (1984). The metabolism of neuropeptides. Both phosphoramidon-sensitive and captopril-sensitive metallopeptidases are present in the electric organ of Torpedo marmorata. *Biochem. J.* 222: 255-259.

TZARTOS S.J. Y LINDSTROM J. (1980). Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 755-759.

UDGAONKAR J.B. Y HESS G.P. (1987). Isosteric regulation of the acetylcholine receptor. *TIPS* 8: 190-192.

VANDLEN R.L., WU W.C.-S., EISENACH J.C. Y RAFTERY M.A. (1979). Studies of the composition of purified Torpedo californica acetylcholine receptor and of its subunits. *Biochemistry* 18: 1845-1854.

VENKATASUBRAMANIAN K., AUDHYA T. Y GOLDSTEIN G. (1986). Binding of thymopoietin to the acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U.S.A. 83: 3171-3174.

VIAMONTES G.I., AUDHYA T. Y GOLDSTEIN G. (1986). Immunohistochemical localization of thymopoietin with an antiserum to synthetic Cys-thymopoietin₂₆₋₃₇. Cell Immunol. 100: 305-313.

VOGEL Z., SYTKOWSKI A.J. Y NIRENBERG M.W. (1972). Acetylcholine receptors of muscle grown in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 3180-3184.

WALKER J.W., LUKAS R.J. Y MCNAMEE M.G. (1981 a). Effects of thio-group modifications on the ion permeability control and ligand binding properties of Torpedo californica acetylcholine receptor. Biochemistry 20: 2191-2193.

WALKER J.W., MCNAMEE M.G., PASQUALE E., CASH D.J. Y HESS G.F. (1981 b). Acetylcholine receptor inactivation in Torpedo californica electroplax membrane vesicles. Detection of two processes in the millisecond and second time regions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100: 86-90.

WALKER J.W., TAKEYASU K. Y MCNAMEE M.G. (1982). Activation and inactivation kinetics of Torpedo californica acetylcholine receptor in reconstituted membranes. Biochemistry 21: 5384-5389.

WARNICK J.E., MALEQUE M.A., BAKRY N., ELDEFRAWI A.T. Y ALBUQUERQUE E.X. (1982). Structure-activity relationships of amantadine. I. Interaction of the N-alkyl analogues with the ionic channels of the nicotinic acetylcholine receptor and electrically excitable membrane. Mol. Pharmacol. 22: 82-93.

WEBER M. Y CHANGEUX J.-P. (1974 a). Binding of Naja nigricollis ³H - α -toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. I. Binding of the tritiated α -neurotoxin in the absence of effector. Mol. Pharmacol. 10: 1-14.

WEBER M. Y CHANGEUX J.-P. (1974 b). Binding of Naja nigricollis ³H - α -toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. II. Effect of cholinergic agonists and antagonists on the binding of the tritiated α -neurotoxin. Mol. Pharmacol. 10: 15-34.

WEBER M. Y CHANGEUX J.-P. (1974 c). Binding of Naja nigricollis ³H - α -toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. III. Effects of local anaesthetics on the binding of the tritiated α -neurotoxin. Mol. Pharmacol. 10: 35-40.

WEBER M., DAVID-PFEUTY T. Y CHANGEUX J.-P. (1975). Regulation of binding properties of the nicotinic receptor protein by cholinergic ligands in membrane fragments from Torpedo marmorata. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3443-3447.

WEILAND G., GEORGIA B., WEE V.T., CHIGNELL C.F. Y TAYLOR P. (1976). Ligand interactions with cholinergic receptor-enriched membranes from Torpedo: influence of agonist exposure on receptor properties. Mol. Pharmacol. 12: 1091-1105.

WEILAND G., GEORGIA B., LAPPI S., CHIGNELL C.F. Y TAYLOR P. (1977). Kinetics of agonist-mediated transitions in state of the cholinergic receptor. *J. Biol. Chem.* 252: 7648-7656.

WEILAND G. Y TAYLOR P. (1979). Ligand specificity of state transitions in the cholinergic receptor: behavior of agonists and antagonists. *Mol. Pharmacol.* 15: 197-212.

WEILL C.L., MCNAMEE M.G. Y KARLIN A. (1974). Affinity-labeling of purified acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61: 997-1003.

WENNOGLE L.P. Y CHANGEUX J.-P. (1980). Transmembrane orientation of proteins present in acetylcholine receptor rich membranes from Torpedo marmorata studied by selective proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 106: 381-393.

WILSON P.T. ,LENTZ T.L. Y HAWROT E. (1985). Determination of the primary amino acid sequence specifying the α -bungarotoxin binding site on the α -subunit of the acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 8790-8794.

YOUNG A.P. Y SIGMAN D.S. (1982). Allosteric effects of volatile anesthetics on the membrane-bound acetylcholine receptor protein. I. Stabilization of the high-affinity state. *Mol. Pharmacol.* 20: 498-505.