

22  
2oj.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO DE MODIFICACION QUIMICA DEL TRANSPORTADOR DE ACETILCOLINA EN VESICULAS SINAPTICAS DEL ORGANO ELECTRICO DEL PEZ Torpedo californica"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A:

LILIANA QUINTANAR VERA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

1998

209659



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

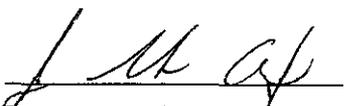
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

Presidente	Prof. Quintero Ruíz Angelina
Vocal	Prof. Velasco Velázquez Jaime Iván
Secretario	Prof. Camacho Arroyo Ignacio
1er. Suplente	Prof. Cerbón Cervantes Marco Antonio
2o. Suplente	Prof. Ibarra Rubio Ma. Elena

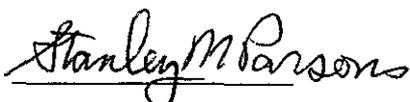
Sitio donde se desarrolló el tema: Universidad de California, Santa Barbara.



---

Prof. Ignacio Camacho Arroyo

Asesor



---

Prof. Stanley M. Parsons

Supervisor Técnico



---

Liliana Quintanar Vera

Sustentante

## AGRADECIMIENTOS

To Stanley Parsons,

for giving me the chance to work on this project,  
for your advice, your teaching and support.

A Ignacio,

por su apoyo y consejo.

A Estela y Acely,

por haberme convencido de hacer lo que ya hice.

A mi papá,

por una canción infantil que despertó a una paloma.

A mis abuelos,

por todo el amor que me han brindado  
y que ha sido el combustible de estos años.

A mi mamá y a Alberto,

por su compañía, su amor y su confianza.

A mi tía Raquel,

por las garnachas que le ha dado a mi vida.

To Naser, *mira piar*,

with a devilangel face.

To Shireen and Wahab,

for your love and the wonderful evenings... and dinners...  
that gave me the energy to work on this project.

A Carlos, *moi brafito*,

por los incontables momentos de palabras y silencios...

To Marie and Laura,

for your support, your company, your advice,  
and most important... for your friendship.

A todos mis amigos de la Facultad... Caro, Ana, Poncho, Emiliano,  
Acely, Luis, Dulce, Greys, Aneí, Marina, Jorge, Estela, Raul, Alan,  
German... y compañía...

porque tengo algo que recordar de cada uno de ustedes...

A Toña y Octavio,

por sus enseñanzas, sus consejos y su cariño.

Al comité organizador de las Olimpiadas de Química,

por la inolvidable experiencia que me ha traído hasta aquí.

A Fundación UNAM y Fundación Telmex,

por su apoyo económico.

Y finalmente, a la UNAM,

por existir...

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Capítulo I. Introducción</b>	2
<b>Capítulo II. Antecedentes</b>	4
<b>II.1. Organización neuronal</b>	4
<b>II.2. Neurotransmisión colinérgica</b>	5
<b>II.3. Vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez <i>Torpedo</i></b>	9
<b>II.4. El transportador vesicular de acetilcolina (TVA)</b>	10
<b>II.5. Estudios de modificación química del TVA</b>	12
<b>Capítulo III. Planteamiento del problema y objetivos</b>	17
<b>Capítulo IV. Materiales y métodos</b>	19
<b>IV.1. Reactivos químicos</b>	19
<b>IV.2. Ensayos de captación de vesamicol tritiado en el filtro</b>	19
<b>IV.3. Estudio de la reacción del TVA con iodoMBS</b>	20
<b>IV.4. Estudio de competencia directa [<sup>3</sup>H]vesamicol-yoduro</b>	22
<b>IV.5. Estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS</b>	22
<b>Capítulo V. Resultados</b>	24
<b>V.1. Estudio de la reacción del TVA con iodoMBS</b>	24
<b>V.2. Estudio de competencia directa [<sup>3</sup>H]vesamicol-yoduro</b>	33
<b>V.3. Estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS</b>	34
<b>Capítulo VI. Discusión</b>	37
<b>VI.1. Estudio de la reacción del TVA con iodoMBS</b>	37
<b>VI.2. Estudio de competencia directa [<sup>3</sup>H]vesamicol-yoduro</b>	42
<b>VI.3. Estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS</b>	44
<b>VI.4. Modelo de las interacciones TVA – iodoMBS - yoduro</b>	47
<b>Capítulo VII. Conclusiones</b>	51
<b>Capítulo VIII. Referencias</b>	53
<b>Apéndice</b>	57
<b>Abreviaturas</b>	61

## RESUMEN

Las vesículas sinápticas colinérgicas son orgánulos neuronales encargados del transporte y almacenamiento de acetilcolina para su posterior liberación en las terminales nerviosas. El transportador vesicular de acetilcolina (TVA) es una proteína de membrana que transporta acetilcolina del citoplasma al interior vesicular. Una droga catiónica llamada vesamicol inhibe la función del TVA al enlazarse a un punto cercano al sitio de enlace de la acetilcolina. A su vez, especies organomercuradas como el cloroMBS inhiben la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol, al reaccionar con dos cisteínas críticas en el TVA, aquí denominadas cisteína 1 y cisteína 2.

En el presente trabajo se caracterizó la reacción de las cisteínas C1 y C2 del TVA con iodoMBS, mediante ensayos de captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol en vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*. Los efectos de las concentraciones de iodoMBS y yoduro, pH y fuerza iónica fueron estudiados. Se demostró que la reacción de la cisteína 1 con iodoMBS es irreversible, mientras que la reacción de la cisteína 2 con iodoMBS presenta un equilibrio sensible al pH y a las concentraciones de ión yoduro y de iodoMBS.

Los equilibrios en disolución del iodoMBS fueron caracterizados, mediante estudios de potenciometría y resonancia magnética protónica. Se encontró que el iodoMBS es capaz de coordinarse con un segundo yoduro y que dicho equilibrio de coordinación afecta a la reacción del TVA con el iodoMBS.

Por otro lado, se realizó un estudio de competencia directa [ $^3\text{H}$ ]vesamicol-yoduro con vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*. Se encontró que el yoduro interacciona con el TVA e inhibe la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol. La interacción del yoduro con el TVA se encuentra relacionada con el sitio de enlace del vesamicol en el TVA.

Finalmente, a partir de todas las observaciones realizadas, se propuso un modelo que describe las interacciones entre el TVA, el iodoMBS y el ión yoduro. El modelo fue ajustado satisfactoriamente a los resultados de un experimento representativo del sistema en estudio.

*Our deepest fear is not that we are inadequate,  
our deepest fear is that we are powerful beyond measure.  
It is our light, not our darkness, that most frightens us.*

Nelson Mandela

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

El estudio del proceso de neurotransmisión es muy importante para la comprensión de la comunicación neuronal. Una de sus etapas es el transporte de neurotransmisores, como la acetilcolina. Las vesículas sinápticas colinérgicas son orgánulos neuronales encargados del transporte y almacenamiento de acetilcolina, para su posterior liberación en las terminales sinápticas. Las vesículas colinérgicas poseen una proteína de membrana que transporta acetilcolina del citoplasma al interior vesicular, conocida como transportador vesicular de acetilcolina (TVA).

Una droga catiónica llamada (-)-trans-2-(4-fenilpiperidino)ciclohexanol (vesamicol) inhibe el transporte de acetilcolina al ser captado por el TVA (Parsons et al., 1993). Se ha demostrado que los sitios de enlace del vesamicol y de la acetilcolina se traslapan (Keller y Parsons, 1998c). Por ello, los ensayos de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol en vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica* son una herramienta muy útil para los estudios de modificación química del TVA y para la caracterización del sitio de enlace de la acetilcolina. Hasta el momento, se sabe de la existencia de una histidina y dos cisteínas críticas para la captación de vesamicol, y se ha demostrado que una de esas cisteínas se encuentra en el sitio de enlace de la acetilcolina (Keller y Parsons, 1998a, b y c).

Los compuestos organomercurados son ampliamente utilizados en estudios de modificación química de proteínas. Especies organomercuradas como el cloroMBS inhiben la captación de vesamicol, al reaccionar selectivamente con las dos cisteínas críticas en el TVA. En el presente trabajo, se caracterizó la reacción de dichas cisteínas con la especie iodoMBS. Los efectos de las concentraciones de ión yoduro y de iodoMBS, la fuerza iónica y el pH fueron estudiados, mediante el uso de ensayos de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol en vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*. La captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol fue un indicador de la modificación del TVA.

Los equilibrios en disolución de especies organomercuradas como el iodoMBS no han sido caracterizados, pero pueden tener un efecto importante en la reacción de las cisteínas del TVA con el iodoMBS. En el presente trabajo, se estudiaron también los equilibrios de coordinación de la especie mercuriobencensulfonato con iones hidróxido y yoduro. Esta información es de gran utilidad para una mejor comprensión y caracterización de la reacción del TVA con el iodoMBS.

Por otro lado, se ha informado que el transporte de acetilcolina es inhibido por aniones como el tetrafenilborato (Anderson et al., 1983b). Para investigar si el ión yoduro es capaz de interaccionar con el TVA e inhibir la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol, se realizó un estudio de competencia directa [<sup>3</sup>H]vesamicol-yoduro. Los resultados de dicho estudio son útiles para una mejor comprensión de los equilibrios en disolución del TVA con el ión yoduro y protones, los cuales tienen un efecto importante en la reacción de las cisteínas del TVA con el iodoMBS.

A partir del análisis de todos los resultados obtenidos, se propuso un modelo que ayuda a la comprensión de las interacciones entre el TVA, el iodoMBS y el ión yoduro.

*Nothing in life is to be feared,  
it is only to be understood.*

Marie Curie

## **CAPÍTULO II**

### **ANTECEDENTES**

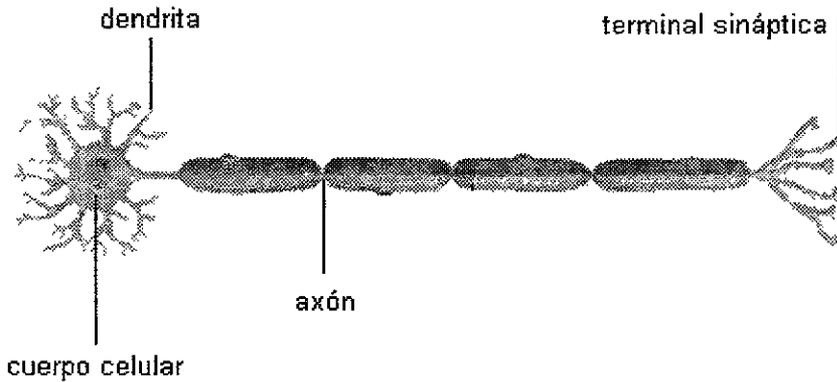
#### **II.1. Organización neuronal**

El ser humano posee una gran capacidad de percepción, procesamiento y almacenamiento de información, comunicación, toma de decisiones y acción. Todo esto es posible gracias a la organización del sistema nervioso, cuyas unidades celulares son las neuronas y las células gliales. Se estima que el cerebro humano contiene  $10^{11}$  neuronas, que se comunican entre sí específica y concertadamente. La comprensión de los mecanismos de comunicación entre neuronas es clave importante para entender el funcionamiento del sistema nervioso.

Las neuronas poseen cuatro regiones morfológicas definidas: el cuerpo celular, las dendritas, el axón y las terminales sinápticas (figura 2.1). El cuerpo celular es el centro metabólico de la neurona, y las dendritas son ramificaciones receptoras que captan las señales procedentes de otras neuronas. El axón es la unidad conductora principal que transporta información; en su extremo se localizan las terminales presinápticas, donde se transmite la información a las terminales postsinápticas de otras neuronas. La neurona que transmite la información es referida como célula presináptica, y a la neurona que recibe la información se le llama célula postsináptica. Al punto de contacto se le llama sinapsis, y el espacio entre las células que se comunican es conocido como espacio intersináptico (Kandel, 1991).

La transmisión sináptica puede ser eléctrica o química; esta última es la más común en el cerebro de los vertebrados. En la neurotransmisión química, un impulso eléctrico en la célula presináptica induce la liberación de una sustancia química, llamada neurotransmisor, hacia el espacio intersináptico. El neurotransmisor liberado activa los receptores de la terminal postsináptica para generar otro impulso eléctrico que transmite la información a la célula postsináptica. Por todos los pasos involucrados, la transmisión sináptica química es más lenta, pero presenta la ventaja de que la señal transmitida puede ser amplificada (Kandel et al., 1991).

Existen diversos tipos de neurotransmisores, y las terminales nerviosas son llamadas de acuerdo al principal neurotransmisor con que funcionan. Una terminal colinérgica es aquella que contiene acetilcolina como neurotransmisor.

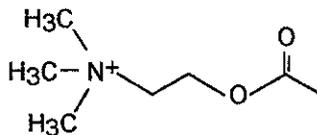


**Figura 2.1.** Unidades morfológicas de una neurona.

## II.2. Neurotransmisión colinérgica

### Síntesis, liberación y degradación de la acetilcolina

La estructura de la acetilcolina se muestra en la figura 2.2, donde se observa claramente el grupo acetilo, y el grupo colina (trimetiletilamina) cargado positivamente.



**Figura 2.2.** Estructura de la acetilcolina.

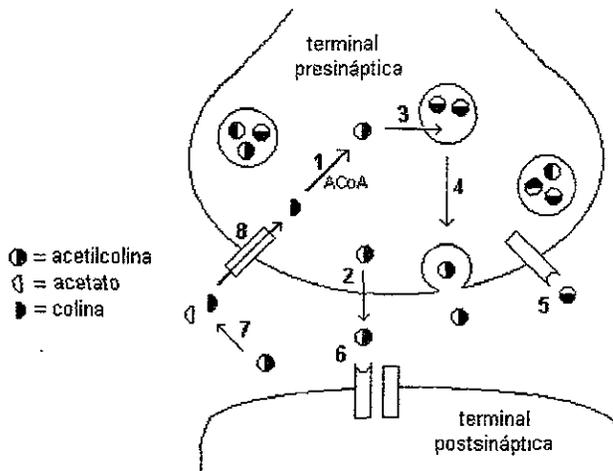
Los pasos principales en el metabolismo de la acetilcolina se esquematizan en la figura 2.3. La colina entra al citoplasma de la terminal presináptica por medio de un sistema de captura que depende de iones sodio, y que posee una gran afinidad por la colina (Kuhar y Murrin, 1978). La colina es acetilada en el citoplasma por la enzima colina-acetiltransferasa, dando lugar a la acetilcolina. La coenzima requerida para este proceso es la acetil coenzima A, que es la especie donadora del grupo acetilo.

A excepción de una pequeña fracción que se fuga de la terminal nerviosa a través de la membrana citoplasmática, la mayor parte de la acetilcolina sintetizada en el citoplasma es almacenada en las vesículas sinápticas para su posterior liberación de la terminal nerviosa. Los almacenes de acetilcolina son pequeños orgánulos llamados vesículas sinápticas. El transportador vesicular de acetilcolina (TVA) es la proteína responsable del transporte de la acetilcolina a través de la membrana vesicular.

Cuando la terminal nerviosa recibe un impulso, las vesículas sinápticas cargadas con acetilcolina sufren exocitosis, es decir, se fusionan con la membrana citoplasmática y liberan acetilcolina en el espacio intersináptico. La acetilcolina liberada activa a los receptores de la terminal postsináptica para propagar la señal. Posteriormente, la acetilcolinesterasa presente en el espacio intersináptico hidroliza a la acetilcolina para dar lugar a acetato y colina; esta última es transportada al interior de la terminal presináptica para cerrar el ciclo metabólico de la acetilcolina (figura 2.3).

#### Características de las vesículas colinérgicas

Las vesículas sinápticas tienen forma esférica, se originan en el aparato de Golgi y son transportados a través de microtúbulos hasta la terminal nerviosa. Dicho transporte es muy lento en comparación con la velocidad a la que las vesículas colinérgicas liberan acetilcolina durante períodos de actividad, por lo que las vesículas sinápticas en la terminal nerviosa deben ser recicladas.

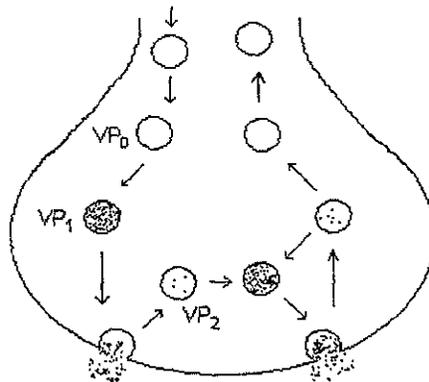


**Figura 2.3.** Esquema del metabolismo de la acetilcolina en la sinapsis. La acetilcolina es sintetizada a partir de colina y acetilcoenzima A (ACoA) (1). Una pequeña fracción de la acetilcolina se fuga a través de la membrana citoplasmática (2) y el resto es almacenado en las vesículas sinápticas (3). La acetilcolina es liberada en el espacio intersináptico (4), donde activa a receptores específicos (5 y 6) y es hidrolizada por la acetilcolinesterasa (7). La colina es transportada al interior de la terminal sináptica (8). Tomado de Dunant e Israel (1985).

El ciclo de vida de las vesículas colinérgicas se muestra en la figura 2.4. Un impulso en la terminal nerviosa deriva en el incremento de la concentración de iones calcio, y las vesículas cargadas con acetilcolina responden a dicho incremento fusionándose con la membrana presináptica y liberando su contenido en el espacio intersináptico (exocitosis). Posteriormente, la membrana vesicular es resellada para reconstituir a la vesícula sináptica (endocitosis), la cual es recargada con acetilcolina para continuar en el ciclo. Las vesículas colinérgicas participan en este ciclo al menos 20 veces antes de ser reemplazadas por vesículas nuevas (Jahn y Sudhof, 1993).

Se conocen al menos tres tipos de vesículas colinérgicas (Parsons et al., 1993):

1. Vesículas nuevas ( $VP_0$ ), que se encuentran vacías y son trasladadas del aparato de Golgi a la terminal sináptica.
2. Vesículas de depósito ( $VP_1$ ), que contienen acetilcolina y nunca han sufrido exocitosis. Estas vesículas se convierten en vesículas activas  $VP_2$  cuando la terminal es excitada.
3. Vesículas activas ( $VP_2$ ), que se encuentran cerca de la membrana presináptica, sufren exocitosis y endocitosis, y son recargadas con acetilcolina continuamente.



**Figura 2.4.** Ciclo de vida de las vesículas sinápticas. Las vesículas sinápticas nuevas ( $VP_0$ ) son trasladadas del aparato de Golgi a la terminal sináptica, donde acumulan acetilcolina ( $VP_1$ ). Posteriormente, cuando la terminal recibe un impulso, las vesículas colinérgicas sufren exocitosis, y son recicladas y recargadas con acetilcolina continuamente ( $VP_2$ ). Finalmente, son reemplazadas por vesículas nuevas. (Parsons et al., 1993).

### **II.3. Vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo***

#### Vesículas colinérgicas del pez *Torpedo*: un modelo de estudio

Gran parte de la información que se tiene acerca de las vesículas colinérgicas ha sido generada por estudios realizados en vesículas tipo VP<sub>1</sub> aisladas del órgano eléctrico del pez *Torpedo*. Estas vesículas son muy útiles para el estudio del transporte y almacenamiento de acetilcolina, dado que son completamente colinérgicas y no se conoce ningún otro neurotransmisor presente en estas preparaciones. La proporción de vesículas colinérgicas en los tejidos nerviosos de otros animales es muy baja, lo cual hace que su aislamiento sea más difícil y menos costeable. Los primeros métodos para el aislamiento y purificación de vesículas colinérgicas del pez *Torpedo* a gran escala fueron desarrollados en la década de 1970 (Nagy et al., 1976; Carlson et al., 1978; Ohsawa et al., 1979).

Las vesículas colinérgicas aisladas del órgano eléctrico del pez *Torpedo* presentan gran similitud en su contenido de acetilcolina, de ATP y de proteína, con aquellas aisladas de otros tejidos animales (Parsons et al., 1993). Así mismo, se ha demostrado que la liberación cuántica de acetilcolina de las terminales nerviosas del órgano eléctrico es muy similar a aquella de las terminales nerviosas en músculos de mamíferos (Dunant y Muller, 1986; Muller y Dunant, 1987). Estas observaciones justifican el uso de las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo* como modelo de estudio, ya que proporcionan información relevante y confiable sobre las vesículas colinérgicas de distintas especies de vertebrados.

#### Propiedades de las vesículas colinérgicas VP<sub>1</sub>

Las vesículas VP<sub>1</sub> aisladas del órgano eléctrico del pez *Torpedo* poseen un diámetro de 80 a 90 nm. Su contenido de proteínas es bajo en comparación con otras membranas, y poseen un proteoglicano altamente inmunogénico que constituye el 25% del total de proteína vesicular (Parsons et al., 1993).

Las vesículas colinérgicas contienen acetilcolina en concentración de 0.4 a 0.8 M, ATP 0.12 M, y GTP 0.02 M (Parsons et al., 1993). Aún no se conocen las funciones

de estos nucleótidos, sin embargo se especula que el ATP debe tener alguna función importante en la regulación del transporte y/o liberación de la acetilcolina. Así mismo, dada la baja concentración de ATP en el citoplasma (10 mM), debe existir un transportador de ATP en la membrana vesicular.

La concentración de la acetilcolina en el citoplasma de las terminales nerviosas es alrededor de 4 mM, lo cual significa que el gradiente de concentraciones de la acetilcolina a través de la membrana vesicular es de 100 a 200. Gradientes del mismo orden se han observado en vesículas colinérgicas aisladas de tejido nervioso en mamíferos (Parsons et al., 1993).

Además de contener en su membrana al transportador vesicular de acetilcolina (TVA), las vesículas colinérgicas poseen una ATPasa, encargada de generar el gradiente protónico necesario para el transporte de la acetilcolina al interior de la vesícula.

#### **II.4. El transportador vesicular de acetilcolina (TVA)**

##### Transporte de acetilcolina

Dado que el gradiente de concentraciones de acetilcolina a través de la membrana vesicular es de alrededor de 100, se estima que la energía requerida para mantener a la acetilcolina almacenada es alrededor de 3 Kcal/mol de acetilcolina. Es evidente entonces, que se requiere de cierta energía para transportar a la acetilcolina del citoplasma al interior de las vesículas sinápticas. Dicha energía es proporcionada por un gradiente de concentraciones de protones, que es impuesto por una ATPasa que también se encuentra en la membrana vesicular.

La ATPasa es una proteína que se activa con iones magnesio o calcio, trabaja en un rango de pH de 5.5. a 9.5, e hidroliza ATP como fuente energética para bombear protones del citoplasma al interior de las vesículas sinápticas (Parsons et al., 1993). Una vez establecido el gradiente protónico, el TVA transporta acetilcolina al interior de la vesícula y libera protones al citoplasma. El transporte de acetilcolina es entonces un proceso que consiste de dos etapas: la formación de un gradiente protónico por una

ATPasa, y el transporte activo de acetilcolina por el TVA, inducido por el gradiente protónico.

La acetilcolina se enlaza al TVA con una constante de disociación de 20 mM. Sin embargo, la constante de Michaelis asociada al transporte activo es de tan sólo 0.3 mM (Parsons et al., 1993). Un modelo cinético para el transporte activo de la acetilcolina ha sido propuesto por Nguyen et al. (1998), quienes han demostrado que el transporte de una molécula de acetilcolina va acompañado de la liberación de dos protones.

El sitio de enlace para la acetilcolina en el TVA es muy poco selectivo; en consecuencia, se han encontrado una gran cantidad de análogos de la acetilcolina que son transportados al interior de la vesículas sinápticas por el TVA (Bahr et al., 1992).

Por otro lado, el transporte activo de acetilcolina es inhibido por fármacos como el vesamicol (que será descrito más adelante) y varios compuestos análogos (Anderson et al., 1983a); se cree que su inhibición se debe a su capacidad para enlazarse al TVA en un sitio cercano al sitio de enlace para la acetilcolina. Además de especies catiónicas como el vesamicol, aniones como el tetrafenilborato también son inhibidores del transporte activo de acetilcolina, aunque su mecanismo de inhibición se desconoce (Anderson et al., 1983b).

Existe otro tipo de transporte, llamado pasivo, que es de naturaleza iónica, y es inhibido en presencia de iones calcio, magnesio y ATP. El transporte pasivo de acetilcolina no requiere de un gradiente protónico y su mecanismo difiere del transporte activo. Se cree que ocurre en vesículas que recientemente han sufrido exocitosis y endocitosis, y que una de sus funciones es liberar los iones sodio captados durante la endocitosis.

### El transportador vesicular de acetilcolina (TVA)

El transportador vesicular de acetilcolina de diferentes especies como el nemátodo *C. elegans*, el pez *Torpedo*, la rata y el humano, ha sido clonado y expresado en líneas celulares de mamíferos como CV-1 (Alfonso et al., 1993; Varoqui et al., 1994; Roghani et al., 1994; Erickson et al., 1994; Usdin et al., 1995 y Erickson et

al., 1996). El TVA en las vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo* contiene 515 aminoácidos y probablemente doce dominios transmembranales. No se sabe en qué parte del transportador se encuentra el sitio de enlace para la acetilcolina, pero Song et al. (1997) demostraron que dos ácidos aspárticos que han sido conservados en los dominios transmembranales 4 y 10, son esenciales para el transporte activo de acetilcolina.

El TVA transporta varios análogos de la acetilcolina, que en muchos casos son hasta 57% más grandes que la acetilcolina misma (Clarkson et al., 1992). Esta pobre especificidad por la acetilcolina sugiere que se trata de un transportador con conformación del tipo de canal iónico cuando transporta acetilcolina (Bahr et al., 1992).

## **II.5. Estudios de modificación química del TVA**

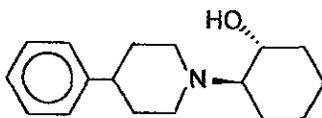
Actualmente, la elucidación de las estructuras de proteínas se ha simplificado en gran medida gracias al uso de técnicas espectroscópicas como la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear; sin embargo, los procesos de purificación y cristalización de proteínas de membrana, como el TVA, representan gran dificultad. Dos métodos básicos que pueden ser usados para el estudio del TVA son: estudios de mutagénesis dirigida y expresión del TVA, y estudios de modificación química selectiva del TVA *in vitro*.

Por estudios de modificación química no es posible determinar específicamente qué aminoácidos en la secuencia del TVA son críticos para su función, sin embargo, es posible identificar de qué tipo de aminoácidos se trata. Por ejemplo, si se identifica por modificación química que lisinas e histidinas son críticas para la función del TVA, los estudios de mutagénesis se ven considerablemente simplificados, ya que el TVA contiene sólo 17 lisinas y 4 histidinas, de entre los 515 aminoácidos de su secuencia. Así, los estudios de modificación química de proteínas pueden ser de gran utilidad para simplificar los estudios de mutagénesis.

### Vesamicol: herramienta para el estudio del TVA

El estudio del TVA fue acelerado tras el descubrimiento de la droga sintética (-)-trans-2-(4-fenilpiperidino)ciclohexanol, llamada vesamicol, que inhibe el transporte de acetilcolina (Anderson et al., 1983a).

La estructura del vesamicol se muestra en la figura 2.5, donde se observa la presencia de una piperidina, que al protonarse semeja al grupo amino (cargado positivamente) de la acetilcolina. El vesamicol se encuentra protonado cuando es captado por el TVA, Kornreich y Parsons (1988) reportaron un pKa de 10.5 asociado al grupo piperidina.



**Figura 2.5.** Estructura del vesamicol.

Un conjunto de evidencias experimentales demostró que el vesamicol inhibe el transporte de acetilcolina porque se enlaza específicamente al TVA (Parsons et al., 1993). Así mismo, se ha detectado la presencia de una histidina, con pKa = 7.1, en el sitio de enlace del vesamicol, cuya protonación impide la captación de vesamicol por el TVA (Keller y Parsons 1998b)

Como se mencionó anteriormente, el transporte de acetilcolina requiere de la actividad de dos proteínas: el TVA y la ATPasa. Por ello, al efectuar modificaciones químicas de las vesículas colinérgicas para estudiar su efecto en el transporte de acetilcolina, es difícil determinar si una inhibición del transporte se debe a una modificación química en el TVA o en la ATPasa. Por el contrario, la captación de vesamicol se encuentra asociada única y exclusivamente al TVA (Parsons et al., 1993), y si una modificación química en las vesículas sinápticas inhibe o altera la captación de vesamicol, se puede asegurar que la modificación química ocurrió en el TVA.

Por lo anterior, los ensayos de captación de vesamicol presentan ventaja frente a los ensayos del transporte de acetilcolina, como herramienta para los estudios de modificación química del TVA. Cualquier alteración o inhibición de la captación de vesamicol es una medida directa de la modificación química efectuada en el TVA exclusivamente.

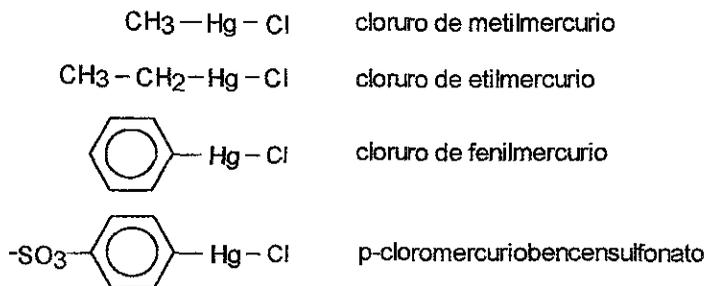
Además, se ha demostrado que los sitios de enlace de la acetilcolina y el vesamicol se encuentran muy cercanos uno del otro, e incluso se traslapan (Keller y Parsons, 1998c). Por ello, la caracterización del sitio de enlace del vesamicol proporcionará valiosa información sobre el sitio de enlace de la acetilcolina en el TVA.

### Modificación química con compuestos organomercurados

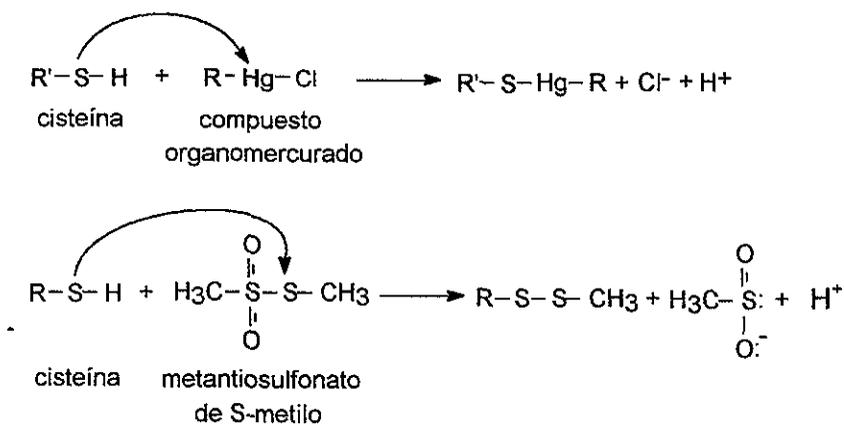
Los compuestos organomercurados (figura 2.6) son comúnmente utilizados en estudios de modificación química en proteínas, ya que reaccionan específica y reversiblemente con cisteínas. Estos compuestos presentan constantes de disociación que varían de  $10^{-16}$  a  $10^{-22}$  M, dependiendo de las condiciones de acidez y otras variables (Simpson, 1961).

Existen otros reactivos químicos selectivos para cisteínas, como por ejemplo el metantiosulfonato de S-metilo (MTSM). En la figura 2.7 se muestra cómo estos reactivos modifican a las cisteínas.

La modificación química de cisteínas en el TVA con algunos compuestos organomercurados, resulta en la inhibición del transporte activo de acetilcolina (Parsons y Koenigsberger, 1980) y de la captación de vesamicol (Kornreich y Parsons 1988). El grado de inhibición de la captación de vesamicol depende del tamaño de los sustituyentes en el compuesto organomercurado y/o del tamaño del agente químico utilizado (Keller y Parsons, 1998a). En la tabla 1 se enlistan las constantes de disociación del vesamicol captado por el TVA, después de la modificación del TVA con diferentes reactivos. La inhibición de captación vesamicol por los reactivos químicos enlistados es reversible con agentes como el  $\beta$ -mercaptoetanol.



**Figura 2.6.** Estructuras de algunos compuestos organomercurados.



**Figura 2.7.** Modificación de cisteínas con reactivos químicos selectivos.

**Tabla 1\***

Reactivo químico	Constante de disociación de vesamicol
-	$3.8 \pm 0.8$ nM
metantiosulfonato de S-metilo	$5.9 \pm 1.2$ nM
cloruro de metilmercurio	$15.2 \pm 3.1$ nM
cloruro de etilmercurio	$240 \pm 46$ nM
acetato de fenilmercurio	$4.9 \pm 0.5$ $\mu$ M
p-clorobencensulfonato	$4.2 \pm 0.8$ $\mu$ M

\*Tomado de Keller y Parsons (1998a).

La inactivación de la captación de vesamicol por la especie p-clorobencensulfonato (cloroMBS) ha sido estudiada en detalle por Keller y Parsons (1998a y c), y ha proporcionado información muy importante sobre los sitios de enlace del vesamicol y la acetilcolina en el TVA. Se han identificado al menos dos diferentes cisteínas que son modificadas por el cloroMBS, aquí referidas como cisteína 1 y cisteína 2. La cisteína 1 reacciona únicamente con compuestos organomercurados, mientras que la cisteína 2 reacciona con todo tipo de reactivo selectivo para cisteínas, incluyendo compuestos organomercurados. La modificación de cualquiera de estas dos cisteínas con la especie cloroMBS da lugar a la inhibición de la captación de vesamicol. Se ha concluido que ambas se encuentran en una cavidad donde la cisteína 2 se localiza en la parte más interna del canal, mientras que la cisteína 1 se encuentra más cercana al citoplasma y está impedida estéricamente.

La cisteína 1 ha sido relacionada con el sitio de enlace de la acetilcolina y del vesamicol. La secuencia de aminoácidos del TVA del pez *Torpedo* ha sido clonado y presenta sólo 8 cisteínas (Varoqui et al., 1994). La identificación de las cisteínas críticas aquí descritas facilitará la localización del sitio de enlace de la acetilcolina y del vesamicol.

*Yo vivo de preguntar, saber no puede ser lujo.*

Silvio Rodríguez

### CAPÍTULO III

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

La droga vesamicol es capaz de enlazarse al TVA e inhibir el transporte de acetilcolina. Estudios de modificación química del TVA con compuestos organomercurados han contribuido a la caracterización de los sitios de enlace para la acetilcolina y el vesamicol. Se han identificado dos cisteínas en el TVA que reaccionan con compuestos organomercurados, como el cloroMBS, lo cual inhibe la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol por el TVA. Keller y Parsons (1998a y c) han estudiado en detalle la reacción de estas dos cisteínas con cloroMBS a pH neutro, en vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*.

Sin embargo, se desconocen los efectos del pH en la reacción de compuestos organomercurados con las cisteínas del TVA, y no se ha caracterizado la reacción con especies organomercuradas donde el grupo saliente es un anión más hidrofóbico, como es el caso del iodoMBS.

Por otro lado, los compuestos organomercurados se caracterizan por presentar equilibrios en disolución de naturaleza muy compleja. A pesar de que estos compuestos son ampliamente utilizados en estudios de modificación química de proteínas, sus equilibrios en disolución no han sido caracterizados.

El presente estudio tiene como objetivo principal:

- Estudiar y caracterizar la reacción de la especie organomercurada iodoMBS con las cisteínas del TVA, a través de ensayos de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol, en vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*.

Dentro de los objetivos particulares se encuentran:

- Estudiar los efectos de las concentraciones de iodoMBS y yoduro, la fuerza iónica y el pH en la reacción del iodoMBS con las cisteínas del TVA, a través de ensayos *in vitro* y de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol, en vesículas sinápticas del pez *Torpedo californica*.

- Determinar si un anión como el yoduro interacciona con el TVA, a través de un estudio de competencia *in vitro* [<sup>3</sup>H]vesamicol-yoduro en vesículas sinápticas del pez *Torpedo californica*.
- Estudiar los equilibrios en disolución del iodoMBS, por medio de técnicas potenciométricas y de análisis espectroscópico.

*Así como tenemos ojos para ver la luz  
y oídos para escuchar los sonidos,  
tenemos un corazón para percibir con él el tiempo,  
y todo el tiempo que no se percibe con el corazón  
está tan perdido como los colores del arcoiris  
para un ciego, o el canto de un pájaro para un sordo.*

**Michael Ende**

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### IV.1. Reactivos químicos

El (-)-trans-2-(4-fenilpiperidino)ciclohexanol (vesamicol) fue sintetizado y marcado con tritio por el Dr. Gary Rogers y el Dr. Stanley Parsons en el Departamento de Química de la Universidad de California, Santa Barbara, según se describe en el Apéndice.

El líquido de centelleo para la determinación espectrofotométrica del vesamicol radioactivo fue adquirido de Cyto Scint ICN Biomedicals. La polietilenimina utilizada para recubrir los filtros fue adquirida de los laboratorios Aldrich como disolución acuosa al 50% en peso. El agua deuterada fue adquirida de Cambridge Isotope Laboratories y el hidróxido de sodio deuterado (NaOD) fue adquirido de Bio Rad Laboratories, en solución al 40% en D<sub>2</sub>O.

El yoduro de potasio (KI) utilizado en todos los experimentos es de alta pureza (99.99%) y fue adquirido de la compañía Alfa AESAR. Los demás reactivos químicos fueron adquiridos de las fuentes comerciales comunes.

La metodología utilizada para la síntesis y purificación del vesamicol tritado, el aislamiento y purificación de las vesículas sinápticas y la determinación del contenido de proteínas en las preparaciones vesiculares (ensayo de Bradford) se encuentra descrita en el Apéndice.

#### IV.2. Ensayos de captación de vesamicol tritado en el filtro

##### Ensayo de captación de vesamicol tritado (captación total)

Los ensayos de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol fueron realizados como se describe a continuación: una alícuota de 90 µL de la suspensión de vesículas sinápticas fue pasada a través de un filtro precubierto con polietilenimina (ver Preparación de filtros en el Apéndice), que fue lavado al vacío con 1 mL de solución amortiguadora de titulación fría (glicina 0.7 M, HEPES 0.1 M, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM, ajustada a pH 7.8 con NaOH).

Posteriormente, con la válvula de vacío cerrada, 40  $\mu\text{L}$  de la solución de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol 400 nM fueron aplicados al filtro. Al cabo de un minuto de incubación en el filtro, la válvula de vacío fue abierta y el filtro fue lavado con cuatro porciones de 1 mL de solución amortiguadora de titulación fría, para eliminar el [ $^3\text{H}$ ]vesamicol no captado por las vesículas sinápticas.

#### Ensayo de captación no específica de vesamicol tritiado

La captación no específica de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol por el filtro o algún otro sitio en las vesículas sinápticas fue determinada para cada muestra siguiendo el procedimiento anterior, pero utilizando una mezcla de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol 400 nM con vesamicol no radioactivo en una concentración 100 veces mayor (40  $\mu\text{M}$ ).

Los filtros fueron sumergidos en 3.5 mL del líquido de centelleo y el contenido de tritio fue analizado con un contador de centelleo líquido (Beckman LS 3155T). Las lecturas se obtuvieron en cuentas por minuto (cpm) y fueron convertidas a unidades de picomol de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol captado por miligramo de proteína (pmol/mg). La conversión de cpm a pmol/mg se encuentra detallada en el Apéndice.

La captación no específica de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol fue restada de la captación total, de tal forma que los resultados presentados en las gráficas corresponden a la captación específica de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol por la proteína. En los casos en que el ensayo de captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol fue realizado por triplicado, los datos graficados corresponden al valor promedio y las barras a la desviación estándar.

### **IV.3. Estudio de la reacción del TVA con iodoMBS**

Para los estudios de inactivación de captación de vesamicol tritiado por iodoMBS, se preparó una disolución concentrada de cloroMBS (10 mM) con KI (100 mM). Para asegurar la total disolución del compuesto se utilizó dimetilsulfóxido al 25% en volumen. Esta disolución fue siempre preparada el mismo día al menos 30 minutos antes de iniciar cada experimento para asegurar el total desplazamiento del ión cloruro.

En todos los experimentos, las vesículas sinápticas fueron diluidas hasta una concentración de 30  $\mu\text{g}$  de proteína por mL de solución amortiguadora, la cual contenía HEPES 0.1 M con KI en la concentración indicada en cada figura, ajustado a pH 7.0 con NaOH. En el estudio de fuerza iónica, la solución amortiguadora también contenía  $\text{NaNO}_3$  en la concentración indicada en la figura. Después de períodos de incubación de 15 a 45 minutos en la solución amortiguadora, una alícuota de la solución de iodoMBS 10 mM fue adicionada a las suspensiones vesiculares para alcanzar la concentración de iodoMBS (de 40  $\mu\text{M}$  a 360  $\mu\text{M}$ ) indicada en cada leyenda en la sección de resultados. Los ensayos de captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol fueron realizados en el filtro periódicamente después de la adición del iodoMBS, de acuerdo al protocolo descrito.

En algunos experimentos la composición de la suspensión vesicular fue modificada después de iniciada la reacción con iodoMBS, para incrementar la concentración del KI, sin alterar la concentración del iodoMBS y de protones.

#### Estudio de pH

En el estudio de pH se utilizó un amortiguador mixto de HEPES 50 mM y MES 50 mM. El pH fue ajustado con NaOH al valor indicado y se adicionó  $\text{NaNO}_3$  para ajustar la concentración de iones sodio al mismo valor para todas las disoluciones en un mismo experimento.

Las vesículas sinápticas fueron incubadas a una concentración de 30  $\mu\text{g}$  de proteína por mL, en la solución amortiguadora del pH indicado, con KI 50 mM. Después de 15 a 45 minutos de incubación, una alícuota de la solución de iodoMBS 10 mM fue adicionada para alcanzar la concentración de iodoMBS indicada en cada leyenda (de 40  $\mu\text{M}$  a 360  $\mu\text{M}$ ). Los ensayos de captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol en el filtro fueron realizados después de 40 minutos de iniciada la reacción.

#### Modificación previa con metantiosulfonato de S-metilo (MTSM)

Se realizaron dos experimentos con vesículas sinápticas modificadas con MTSM: un estudio de concentraciones de iodoMBS y de KI, a pH 6.5, y un estudio de

pH. Una disolución de MTSM (1 mM) fue preparada en HEPES 0.1 M, pH 7.0, el mismo día, pocos minutos antes de iniciar el experimento. Las vesículas fueron incubadas en concentración 300 µg/mL con MSTM 100 µM durante dos horas en HEPES 0.1 M, pH 7.0.

Después de la modificación con MTSM las vesículas fueron diluidas hasta 30 µg/mL en la solución amortiguadora correspondiente, para iniciar la reacción con iodoMBS. El pH, las concentraciones de KI y de iodoMBS utilizados se indican en cada figura. Los ensayos de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol en el filtro fueron realizados después de 40 minutos de iniciada la reacción.

#### **IV.4. Estudio de competencia directa [<sup>3</sup>H]vesamicol - yoduro**

Las vesículas sinápticas (10 µg/mL) fueron incubadas con [<sup>3</sup>H]vesamicol (2.5 nM) en un amortiguador mixto de HEPES 50 mM y MES 50 mM con la concentración de KI y al pH indicados en la leyenda de la figuras, en la sección de resultados. Después de una hora de incubación, 900 µL de la suspensión vesicular fueron filtrados al vacío a través de un filtro precubierto con polietilenimina, y el filtro fue lavado cuatro veces con 1 mL de solución amortiguadora de titulación fría (glicina 0.7 M, HEPES 0.1 M, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM, ajustada a pH 7.8 con NaOH). Para determinar la captación no específica de [<sup>3</sup>H]vesamicol para cada muestra, las vesículas sinápticas fueron incubadas bajo las mismas condiciones, con vesamicol no radioactivo (1 µM).

Los filtros fueron procesados como se describió anteriormente. Los datos graficados corresponden a la cantidad de [<sup>3</sup>H]vesamicol captado por mg de proteína.

#### **IV.5. Estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS**

En el estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS se utilizó el compuesto hidroximBS como materia prima, para mayor simplicidad de los equilibrios en disolución involucrados. De haberse utilizado cloroMBS, la concentración de iones cloruro hubiese sido una variable más.

### Estudios de resonancia magnética protónica (RMP)

Se realizaron dos estudios de RMP: una titulación del hidroximBS con KI, y un estudio de pH. Todas las muestras fueron preparadas en agua deuterada.

En la titulación con KI, se analizaron once muestras que contenían hidroximBS (1 mM), amortiguador HEPES (10 mM) y diferentes concentraciones de KI (de 0 a 200 mM), ajustadas a pD 7.0 con hidróxido de sodio deuterado (NaOD).

El estudio de pH se realizó a tres diferentes concentraciones de KI (0, 1.1 y 50 mM). Las muestras contenían: hidroximBS (1 mM), KI en la concentración indicada, y amortiguadores HEPES y MES (10 mM cada uno). El pD fue ajustado al valor indicado (de 5.0 a 9.0) con NaOD.

Las muestras fueron analizadas a una temperatura controlada de 23°C, en instrumentos Unity INOVA de 400 y 500 MHz. El número de acumulaciones para cada espectro fue de 64, lo cual equivale a un tiempo de análisis de aproximadamente 15 minutos. En algunos de los casos, una presaturación del espectro fue necesaria para eliminar la señal del disolvente y optimizar la proporción señal : ruido en los espectros.

### Titulación potenciométrica

5 mL de una disolución acuosa de hidroximBS 1 mM fueron titulados con KI (10 mM), y el pH fue medido periódicamente. Las disoluciones fueron preparadas con agua previamente hervida y almacenada en un recipiente sellado para reducir el contenido de carbonatos. Durante la titulación, la solución fue burbujeada con nitrógeno y el recipiente de titulación fue sellado con parafilm. La disolución de KI fue preparada inmediatamente antes de su uso a partir de yoduro de potasio de alta pureza.

*El ojo que ves no es  
ojo porque tú lo veas;  
es ojo porque te ve.*

Antonio Machado

## CAPÍTULO V

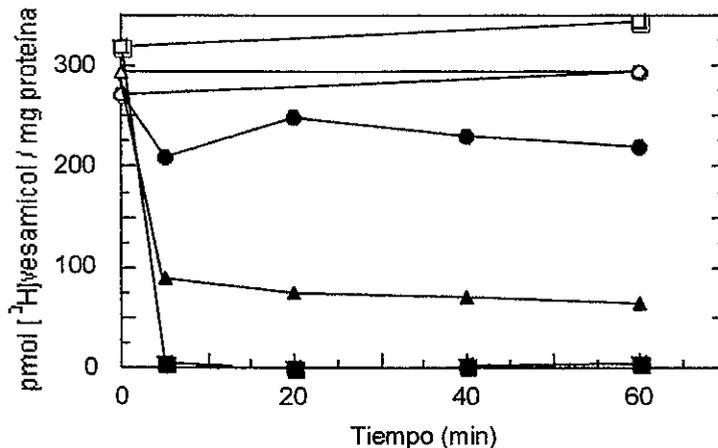
### RESULTADOS

#### V.1. Estudio de la reacción del TVA con iodoMBS

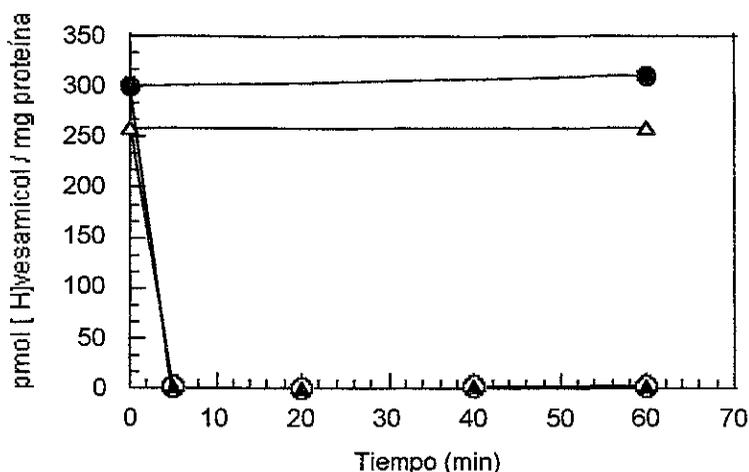
##### Efecto de la concentración de yoduro de potasio (KI) y la fuerza iónica

Las vesículas fueron incubadas con iodoMBS (160  $\mu\text{M}$ ) a pH 7.0, y se observó que la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol fue inactivada en mayor proporción a bajas concentraciones de KI (figura 5.1). La inactivación fue completa en KI 1.6 mM. En todos los casos, la inactivación ocurrió rápidamente y no se observó mayor avance de la reacción después de los cinco primeros minutos.

El iodoMBS (160  $\mu\text{M}$ ) también inactivó la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol a una baja concentración de KI (1.6 mM), en presencia de altas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  (figura 5.2).



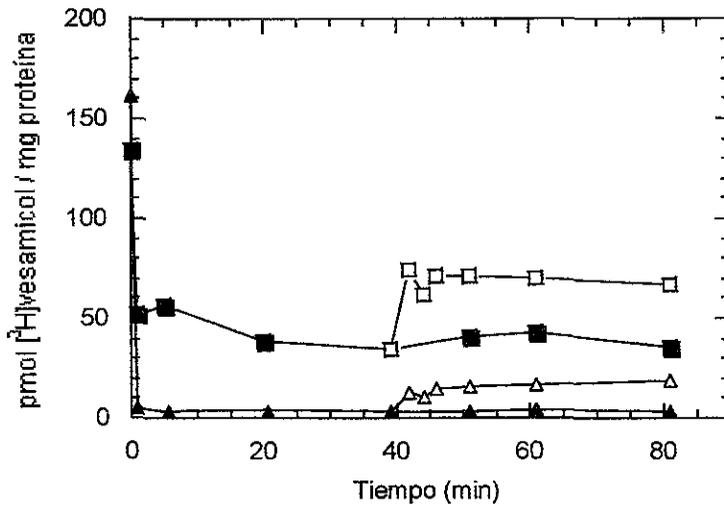
**Figura 5.1.** Efecto de la concentración de KI en la inactivación de la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol por iodoMBS (160  $\mu\text{M}$ ), en vesículas sinápticas. Las vesículas fueron incubadas a pH 7.0 con KI 1.6 (-■-), 50 (-▲-), y 250 mM (-●-). Las suspensiones control contenían KI: 0 (-□-), 50 (-Δ-) y 250 mM (-○-), sin iodoMBS.



**Figura 5.2.** Efecto de la fuerza iónica en la inactivación de la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol por iodoMBS (160 μM), en vesículas sinápticas. Las vesículas fueron incubadas a pH 7.0 con KI 1.6 mM, y NaNO<sub>3</sub> 50 (-○-) y 250 mM (-▲-). Las suspensiones control contenían NaNO<sub>3</sub> 50 (-●-) y 250 mM (-▲-).

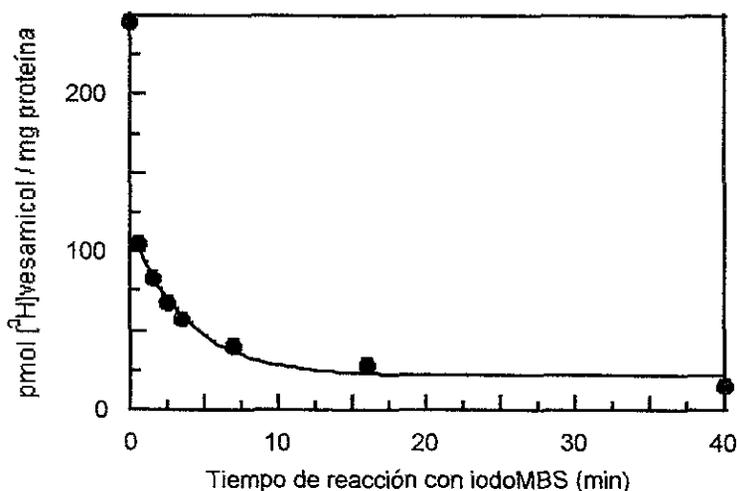
#### Efecto del ión yoduro en el equilibrio de la reacción

Después de 40 minutos de reacción con iodoMBS (160 μM) a pH 7.0, en presencia de KI 1.6 y 100 mM, se incrementó la concentración de KI a 500 mM. En la suspensión vesicular con KI 1.6 mM, la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol fue inactivada completamente a los 40 minutos de reacción y al incrementar la concentración de KI se recuperó el 11% de la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol (figura 5.3). Por otro lado, en la suspensión con KI 100 mM, a los 40 minutos de reacción la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol observada era del 25% y al incrementar la concentración de KI la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol se recuperó hasta un 50% (con respecto a la suspensión control).



**Figura 5.3.** Recuperación de la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol por adición de KI. Las vesículas sinápticas fueron incubadas a pH 7.0 con KI 1.6 (-▲-) y 100 mM (-■-). Después de 40 minutos de reacción con iodoMBS (160 μM), la concentración de KI se incrementó a 500 mM en ambas suspensiones: (-△-) y (-□-), respectivamente. La captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol de cada suspensión control (sin iodoMBS) es el punto graficado al tiempo cero.

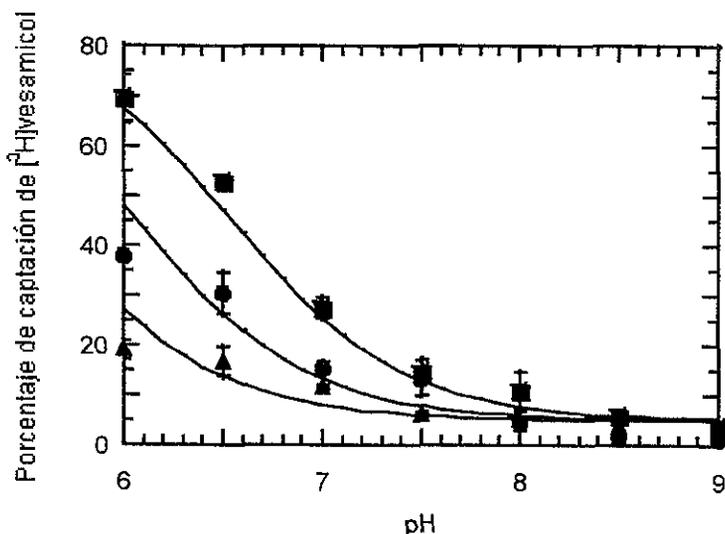
En el siguiente experimento se incrementó la concentración de KI a 500 mM en una suspensión vesicular con KI 1.6 mM, a diferentes tiempos después de iniciada la reacción con iodoMBS (160  $\mu$ M). La captación de [ $^3$ H]vesamicol recuperada disminuyó exponencialmente con respecto al tiempo de reacción con una constante de velocidad  $k = 0.26 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$  (figura 5.4).



**Figura 5.4.** Cinética de la recuperación de la captación de [ $^3$ H]vesamicol en vesículas sinápticas, por adición de KI. Las vesículas fueron incubadas con KI 1.6 mM, pH 7.0. Se adicionó iodoMBS (160  $\mu$ M) al tiempo cero. Periódicamente, la concentración de KI se incrementó a 500 mM en alícuotas tomadas de la suspensión. Después de 20 minutos de incubación en KI 500 mM, se realizó el ensayo de captación de [ $^3$ H]vesamicol en filtro ( $\bullet$ ). Un modelo de decaimiento exponencial (—) fue ajustado a los datos. La captación de [ $^3$ H]vesamicol de la suspensión control (sin iodoMBS) es el punto graficado al tiempo cero.

### Efecto del pH en la reacción con iodoMBS

Se realizó un estudio de pH a tres diferentes concentraciones de iodoMBS y KI 50 mM (figura 5.5). La captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol disminuyó a medida que el pH aumentó; y para un mismo valor de pH, a mayor concentración de iodoMBS, menor captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol fue detectada. Estos datos fueron ajustados a un modelo matemático que será descrito en la sección de Discusión.

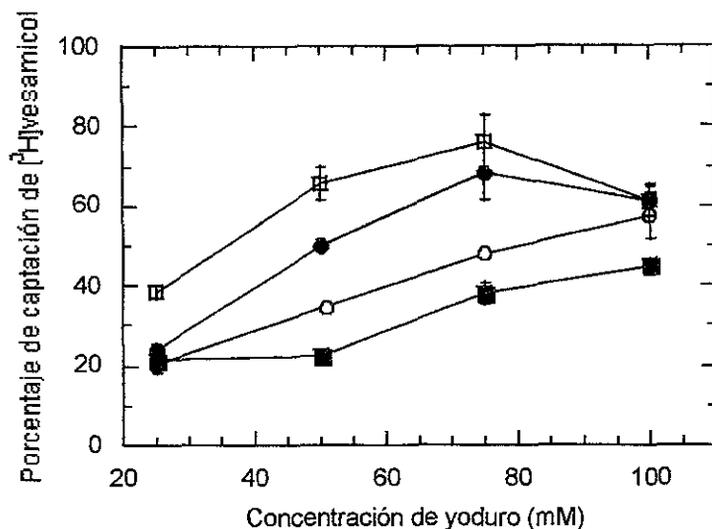


**Figura 5.5.** Efecto del pH en la reacción del TVA con iodoMBS, a diferentes concentraciones de iodoMBS, en vesículas sinápticas. Las vesículas fueron incubadas al pH indicado con KI 50 mM. El ensayo de captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol se realizó después de 40 minutos de reacción con iodoMBS 40  $\mu\text{M}$  (-■-), 120  $\mu\text{M}$  (-●-) y 360  $\mu\text{M}$  (-▲-). Los resultados se presentan en forma de porcentajes de captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol con respecto a la suspensión control correspondiente (sin iodoMBS). Los datos fueron ajustados a un modelo matemático (—) descrito en la sección de Discusión.

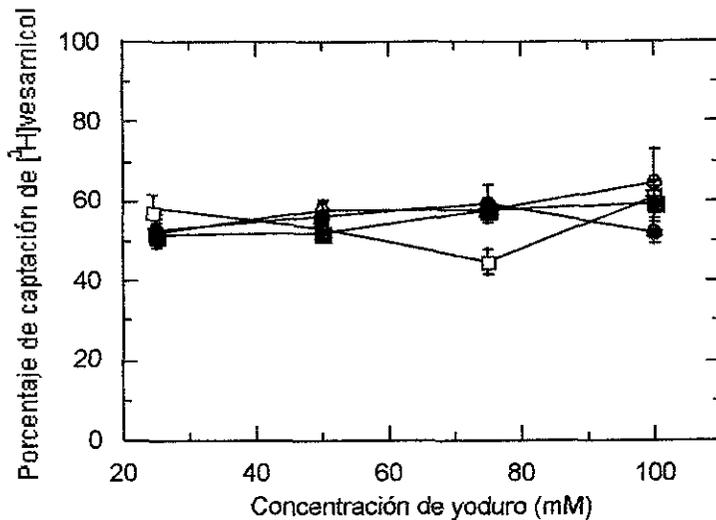
### Efecto de la modificación con metantiosulfonato de S-metilo (MTSM)

Se realizó un estudio de variación de concentraciones de iodoMBS y KI con vesículas sinápticas previamente modificadas con MTSM. A manera de control, se realizó el mismo experimento con vesículas sinápticas intactas, que no fueron modificadas con MTSM. En el experimento control (figura 5.6), se observó mayor captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol al incrementar la concentración de KI, y menor captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol a mayor concentración de iodoMBS. En cambio, en el estudio realizado con vesículas sinápticas previamente modificadas con MTSM (figura 5.7), la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol fue prácticamente la misma en todos los casos. La modificación con MTSM eliminó el efecto del iodoMBS y del KI.

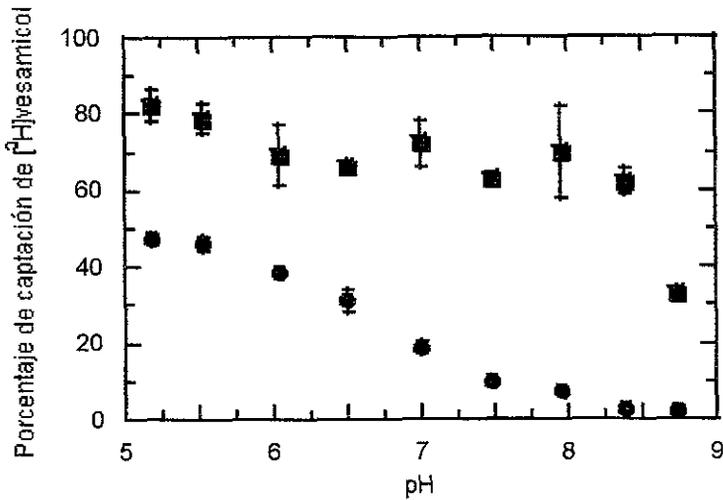
Un estudio de pH con KI (50 mM) fue realizado con vesículas sinápticas previamente modificadas con MTSM (figura 5.8). Paralelamente se realizó un experimento control con vesículas intactas, en el cual se observó el mismo efecto de pH obtenido en el experimento de la figura 5.5. La inactivación con iodoMBS en vesículas modificadas con MTSM no presentó ninguna dependencia con respecto al pH. El porcentaje de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol varió irregularmente del 62 al 82%.



**Figura 5.6.** Estudio de variación de concentraciones de iodoMBS y KI con vesículas intactas (experimento control). Las vesículas fueron incubadas a pH 6.5 con la concentración de KI indicada. El ensayo de captación de  $[^3\text{H}]$ vesamicol se realizó después de 40 minutos de reacción con iodoMBS: 40  $\mu\text{M}$  (-□-), 80  $\mu\text{M}$  (-●-), 120  $\mu\text{M}$  (-○-) y 160  $\mu\text{M}$  (-■-). Los resultados se presentan en forma de porcentajes de captación de  $[^3\text{H}]$ vesamicol con respecto a la suspensión control correspondiente (sin iodoMBS)



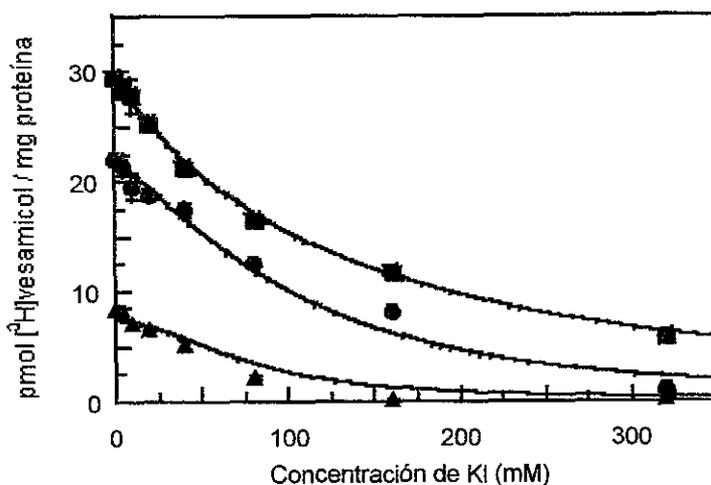
**Figura 5.7.** Estudio de variación de concentraciones de iodoMBS y KI con vesículas sinápticas previamente modificadas con MTSM. Las vesículas fueron incubadas a pH 6.5 con la concentración de KI indicada. El ensayo de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol se realizó después de 40 minutos de reacción con iodoMBS 40 μM (-□-), 80 μM (-●-), 120 μM (-○-) y 160 μM (-■-). Los resultados se presentan en forma de porcentajes de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol con respecto a la suspensión control correspondiente (sin iodoMBS).



**Figura 5.8.** Efecto del pH con vesículas intactas (-●-) y vesículas previamente modificadas con MTSM (-■-). Las vesículas fueron incubadas al pH indicado con KI (50 mM). El ensayo de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol se realizó después de 40 minutos de reacción con iodoMBS (160 μM). Los resultados se presentan en forma de porcentajes de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol con respecto a la suspensión control correspondiente (sin iodoMBS)

## V.2. Estudio de competencia directa [<sup>3</sup>H]vesamicol - yoduro

Las vesículas fueron incubadas con [<sup>3</sup>H]vesamicol y KI al mismo tiempo en un estudio de competencia, y se observó que el KI inhibe la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol, y dicha inhibición fue dependiente del pH (figura 5.9).



**Figura 5.9.** Competencia directa del yoduro en la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol por vesículas sinápticas. Las vesículas fueron incubadas 40 minutos a pH 6.56 (▲-), 7.18 (●-) y 7.81 (■-) con [<sup>3</sup>H]vesamicol 2.5 nM y KI en la concentración indicada. Los datos fueron ajustados a un modelo matemático (—), descrito en la sección de Discusión.

### V.3. Estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS

#### Estudios de resonancia magnética protónica (RMP)

El espectro de RMP del hidroximBS presenta en la región aromática dos dobletes, aquí referidos como doblete A y doblete B, que corresponden a los dos tipos de protones presentes en la molécula. La constante de acoplamiento de dos señales es la diferencia entre sus desplazamientos químicos. La constante de acoplamiento entre los dos dobletes fue aproximadamente 0.250 ppm.

En los espectros del hidroximBS (1 mM) a pD 7.0 con diferentes concentraciones de KI, un segundo par de dobletes (referidos como C y D) surgió a partir de KI 0.5 mM. La intensidad de los dobletes C y D incrementó con la concentración de KI, a la vez que la intensidad de los dobletes A y B disminuyó (figura 5.10).

Las integrales de los dobletes C y D se graficaron en función de la concentración de KI y se ajustó un modelo matemático con el programa Scientist (Micromath) para determinar la constante de disociación de la nueva especie formada, la cual resultó ser  $K_d = 11 \pm 2$  mM.

En los espectros del hidroximBS (1 mM) a diferentes niveles de acidez, las constantes de acoplamiento y las integrales de los dobletes observados no variaron en función del pD.

#### Titulación potenciométrica

Los datos obtenidos de la titulación potenciométrica fueron convertidos a valores de concentración de ión hidróxido (figura 5.11). Al adicionar KI a la solución de hidroximBS se observó un incremento en el pH. Un modelo matemático fue ajustado a los datos con el programa Scientist (Micromath) para determinar la constante de equilibrio de la reacción involucrada ( $K_{OH_I} = 0.096 \pm 0.003$ ).

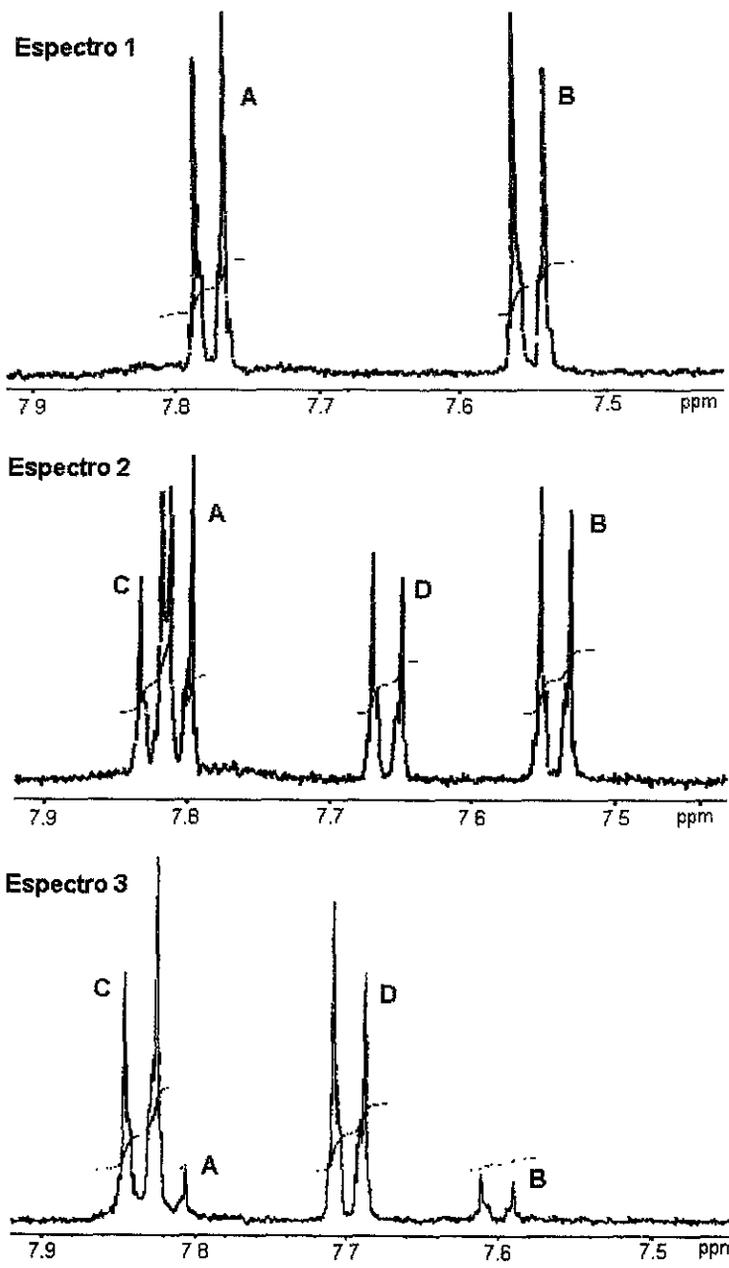
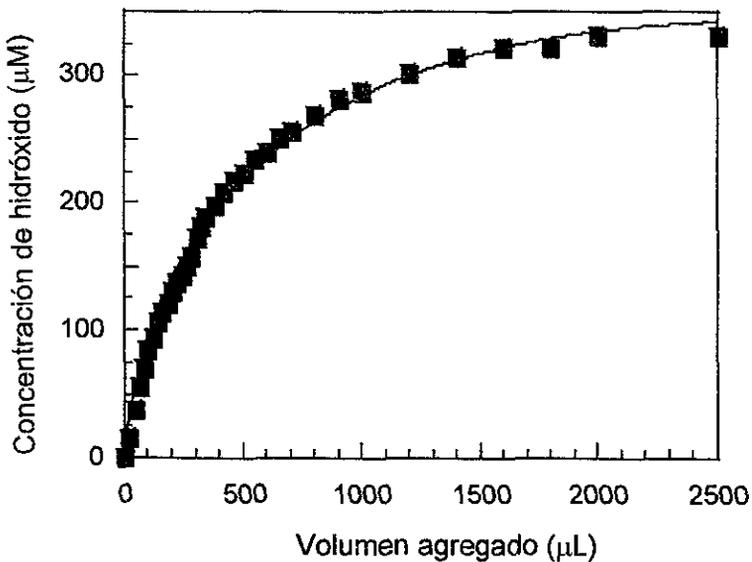


FIGURA 5.10

**Figura 5.10.** Titulación de hidroximBS (1 mM) con KI a pD=7.0. **Espectro 1:** hidroximBS en ausencia de KI, se observan dos dobletes (A y B). **Espectro 2:** hidroximBS con KI 10 mM, se observan dos nuevos dobletes (C y D) que integran para el 45% del hidroximBS total. **Espectro 3:** hidroximBS con KI 100 mM, los dobletes C y D integran para el 83% del hidroximBS total, mientras los dobletes A y B integran para el 17% restante.



**Figura 5.11.** Titulación de hidroximBS (1 mM) con KI (10 mM). Datos experimentales (-■-) y modelo matemático (—).

*Confidence comes not from always being right,  
but from not fearing to be wrong.*

Peter T. McIntyre

## CAPÍTULO VI

### DISCUSIÓN

#### VI.1. Estudio de la reacción del TVA con iodoMBS

Dos de las cisteínas presentes en el transportador de acetilcolina (TVA) fueron identificadas por Keller y Parsons (1998a) por ser críticas para la captación de vesamicol. La reacción de dichas cisteínas con especies organomercuradas como el cloroMBS o el iodoMBS resulta en la incapacidad del TVA para captar [ $^3\text{H}$ ]vesamicol (Kornreich and Parsons, 1988; Keller y Parsons, 1998a). Para el análisis de los resultados obtenidos en los estudios de inactivación con iodoMBS, la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol es el criterio para determinar si la reacción entre las cisteínas del TVA y el iodoMBS ha ocurrido o no.

#### Efecto de la concentración de KI y la fuerza iónica

En presencia de altas concentraciones de KI (50 y 250 mM) no se obtuvo la inactivación completa de la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol (figura 5.1). La captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol en el estado de equilibrio depende de la concentración de KI. Esto significa que la reacción con iodoMBS ocurre rápidamente, pero es menos favorecida a altas concentraciones de KI. Keller y Parsons (1998a) estudiaron la reacción del TVA con varios compuestos organomercurados, y la presencia de altas concentraciones (hasta 200 mM) de sales como el NaCl y el NaBr nunca interfirió con la reacción en estudio. Lo anterior sugiere que el efecto observado en la figura 5.1 es un efecto propio del ión yoduro.

Los resultados presentados en la figura 5.1 demuestran que es posible lograr completa inactivación de la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol cuando la concentración de KI es muy baja (1.6 mM). El haber obtenido completa inactivación a altas concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  con KI 1.6 mM (figura 5.2), demuestra que la fuerza iónica de la solución no interfiere con la reacción del TVA con el iodoMBS; es decir, que el efecto observado no es un efecto de la fuerza iónica.

### Efecto del ión yoduro en el equilibrio de la reacción

El equilibrio de la reacción puede ser descrito por:



(Ec. 1)

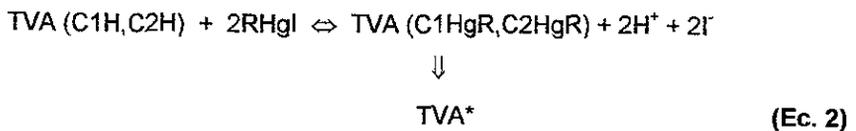
donde TVA (C1H,C2H) representa a la proteína con las dos cisteínas intactas en forma -SH, RHgl es la especie coordinada iodoMBS, y TVA (C1HgR,C2HgR) representa a la proteína con ambas cisteínas modificadas con la especie mercuriobencensulfonato (-HgR). Esta última forma de la proteína prácticamente no capta [<sup>3</sup>H]vesamicol en las condiciones de los experimentos realizados.

Para lograr una mejor caracterización de la acción del yoduro en el equilibrio, se hicieron reaccionar vesículas sinápticas con iodoMBS a dos concentraciones de KI (1.6 y 100 mM), y una vez alcanzado el equilibrio se incrementó la concentración de KI a 500 mM en ambas mezclas de reacción (figura 5.3). Los resultados del experimento coinciden con el equilibrio descrito: al incrementar la concentración de KI, la reacción es menos favorecida y se observa un aumento en la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol.

Por principios de termodinámica, al aumentar la concentración del ión yoduro a 500 mM en ambas suspensiones se debería alcanzar un mismo estado de equilibrio sin importar el estado inicial. Es decir, que si se tratara de un sistema en equilibrio simple, las dos suspensiones presentarían la misma captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol después de la adición del KI. Sin embargo, las vesículas que habían reaccionado con iodoMBS en KI 1.6 mM presentaron una recuperación de la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol mucho menor que las vesículas que habían reaccionado en KI 100 mM (figura 5.3). Este resultado implica que la capacidad del yoduro para recuperar la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol depende del estado inicial del sistema.

Se realizó un estudio cinético (figura 5.4) donde se observó que la capacidad del yoduro para recuperar la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol en una suspensión vesicular con una concentración inicial de KI 1.6 mM, decae exponencialmente al avanzar la reacción con iodoMBS. Dado que en presencia de KI 1.6 mM las dos cisteínas del TVA

reaccionan rápida y completamente con iodoMBS, el resultado del estudio cinético sugiere que una reacción o un proceso secundario irreversible ocurre después de que ambas cisteínas han reaccionado, de tal forma que el yoduro ya no es capaz de desplazar el equilibrio y recuperar la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol. Dicho proceso secundario podría ser un cambio conformacional de la proteína, el cual no pudo ser detectado en el experimento anterior porque no tiene efecto alguno en la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol. La única evidencia de este proceso es que la nueva especie o conformación ya no participa en el equilibrio arriba escrito y por tanto, un incremento en la concentración del yoduro ya no es capaz de desplazar el equilibrio y recuperar la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol. El esquema para dicho modelo sería:



donde TVA\* representa a la proteína en el nuevo estado o conformación.

El decaimiento es de primer orden y la cantidad de proteína que se transforma en la nueva especie o conformación (TVA\*) depende de la concentración de proteína modificada TVA (C1HgR,C2HgR), la cual a su vez depende del equilibrio. A altas concentraciones de ión yoduro, el equilibrio está desplazado hacia la izquierda y la concentración de la especie TVA (C1HgR,C2HgR) es menor; por tanto, el proceso secundario debe ser más lento en presencia de altas concentraciones de yoduro.

Esta hipótesis explica los resultados del experimento anterior (figura 5.3). En la suspensión con KI 1.6 mM el proceso secundario fue mucho más rápido y a los 40 minutos de reacción prácticamente toda la proteína había sido transformada a la forma TVA\*; es por ello que la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol recuperada al incrementar la concentración de yoduro fue muy pequeña. Mientras tanto, en la suspensión con KI 100 mM el proceso secundario ocurrió más lentamente y a los 40 minutos de reacción todavía había una cantidad considerable de proteína en la forma TVA (C1HgR,C2HgR), cuya captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol pudo ser recuperada al desplazar el equilibrio con un incremento en la concentración de yoduro. De esta manera se explica por qué la

captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol recuperada en la suspensión con KI 100 mM fue considerablemente mayor que la obtenida en la suspensión con KI 1.6 mM.

#### Efecto del pH en la reacción con iodoMBS

El equilibrio arriba descrito (ec. 2) implica que debe existir un efecto de la concentración de protones en la reacción del TVA con iodoMBS. El estudio de pH realizado (figura 5.5) demostró que dicho efecto es apreciable en presencia de KI 50 mM. A mayor concentración de protones, el equilibrio es desplazado hacia la izquierda y se obtiene mayor captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol; mientras que, al aumentar el pH, la concentración de protones es menor, el equilibrio se desplaza hacia la derecha y la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol disminuye.

El estudio de pH fue realizado a diferentes concentraciones de iodoMBS y el resultado fue congruente con el equilibrio descrito: a mayor concentración de iodoMBS, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la derecha, y se observa menor captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol. El modelo matemático ajustado a estos datos será descrito en detalle más adelante.

#### Estudios de modificación con metantiosulfonato de S-metilo (MTSM)

El MTSM es un reactivo específico para la modificación química de cisteínas. Se ha demostrado que el MTSM es capaz de reaccionar selectivamente con sólo una de las dos cisteínas que reaccionan con compuestos organomercurados, la cual es aquí referida como cisteína 2 (Keller and Parsons, 1998c). Cuando el TVA es modificado con MTSM, el iodoMBS no puede reaccionar con la cisteína 2 (Keller and Parsons, 1998a).

Para caracterizar la reacción de la cisteína 1 con iodoMBS, vesículas sinápticas previamente modificadas con MTSM se hicieron reaccionar con diferentes concentraciones de iodoMBS, en diferentes concentraciones de KI, y a diferentes valores de pH (figuras 5.7 y 5.8)

Se esperaría que el equilibrio de la reacción de la cisteína 1 con iodoMBS también fuera sensible a las concentraciones de iodoMBS, de protones y de yoduro.

Sin embargo, cambios en el pH y las concentraciones de iodoMBS y yoduro no tuvieron efecto alguno en la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol (figuras 5.7 y 5.8). Los resultados de estos dos experimentos demuestran claramente que las concentraciones de yoduro, iodoMBS y protones no tienen efecto en el equilibrio de la reacción del iodoMBS con el TVA modificado con MTSM. La única forma de explicar estos resultados es considerar que la reacción de la cisteína 1 con el iodoMBS es irreversible, y por ello no responde en absoluto a las concentraciones de iodoMBS, yoduro y protones. Esto significa que los efectos del yoduro, iodoMBS y protones observados en experimentos previos, estaban relacionados únicamente al equilibrio de la reacción de la cisteína 2 con iodoMBS.

Se ha demostrado que la cisteína 1 no reacciona con el MTSM porque se encuentra impedida estéricamente (Keller and Parsons, 1998c). La cisteína 1 reacciona únicamente con compuestos organomercurados gracias a que, a diferencia del átomo de azufre del MTSM, el átomo de mercurio es capaz de polarizarse y formar un enlace con el azufre de la cisteína 1. Los resultados de los experimentos con MTSM indican que el enlace formado entre el mercurio y el azufre de la cisteína 1 es muy estable y la reacción no puede ser revertida con altas concentraciones de yoduro o protones.

En contraste, el enlace del mercurio con la cisteína 2 presenta menor estabilidad y en las condiciones de los experimentos presentados, es posible apreciar el equilibrio involucrado y sus desplazamientos al variar las concentraciones de yoduro, iodoMBS y protones. De esta manera se explica por qué los efectos del yoduro, iodoMBS y pH observados anteriormente, desaparecen al bloquear a la cisteína 2 con MTSM.

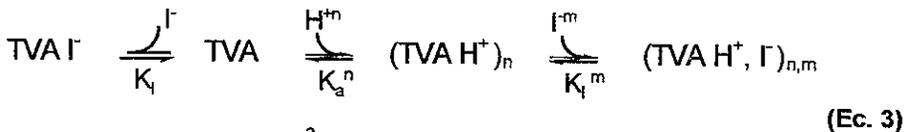
Esta es la primera vez que se detectan diferencias en las reactividades de las cisteínas 1 y 2 frente a compuestos organomercurados como el iodoMBS. Esta información será de gran utilidad para futuros estudios de modificación química del TVA con compuestos organomercurados.

## VI.2. Estudio de competencia directa [<sup>3</sup>H]vesamicol – yoduro

Para investigar si existen interacciones entre la proteína y el yoduro, las vesículas sinápticas fueron incubadas al mismo tiempo con yoduro y [<sup>3</sup>H]vesamicol, de tal forma que, si el yoduro interacciona con la proteína, dicha interacción se ve reflejada directamente en la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol.

Los resultados expuestos en la figura 5.9 demuestran claramente que el yoduro está interaccionando con la proteína e inhibiendo la captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol. Dicha interacción depende del pH de la suspensión vesicular.

Para caracterizar la interacción de la proteína con el yoduro, varios modelos fueron propuestos. Aquí se discutirá el modelo que mejor simuló los datos experimentales, el cual considera los siguientes equilibrios:



(Ec. 4)

donde TVA representa a la proteína intacta, que participa en un equilibrio de protonación con una constante de acidez  $K_a$ , dando lugar a la especie  $\text{TVA } \text{H}^+$ . Ambas formas de la proteína,  $\text{TVA}$  y  $\text{TVA } \text{H}^+$ , se coordinan con el yoduro para formar a las especies  $\text{TVA } \Gamma^-$  y  $\text{TVA } \text{H}^+ \Gamma^-$ , respectivamente. Se introdujo un coeficiente de Hill ( $n$ ) en el equilibrio de protonación del TVA, y otro coeficiente de Hill ( $m$ ) en el equilibrio de la reacción del TVA protonado con yoduro. Por último, el TVA intacto capta [<sup>3</sup>H]vesamicol para formar a la especie  $\text{TVA } [^3\text{H}]\text{ves}$ , cuya constante de disociación se expresa como  $K_{\text{ves}}$ . Cabe hacer notar que el modelo considera que las especies  $\text{TVA } \text{H}^+$ ,  $\text{TVA } \Gamma^-$ , y  $\text{TVA } \text{H}^+ \Gamma^-$  no pueden captar [<sup>3</sup>H]vesamicol.

La constante de disociación para los equilibrios de coordinación con yoduro fue considerada como la misma  $K_I$  sin importar si el TVA se encuentra protonado o no. Esto significa que la interacción con el yoduro no se ve afectada por la protonación del TVA,

y el valor de  $K_i$  es el mismo en ambos casos.

Las ecuaciones de los equilibrios arriba descritos fueron insertadas en un modelo matemático para simular los datos experimentales. Del trabajo de Keller y Parsons (1998a), se sabe que el valor de la constante  $K_{ves}$  es  $3.8 \pm 0.8$  nM; por lo que las constantes  $K_a$ ,  $K_i$ ,  $n$  y  $m$  fueron los parámetros ajustables. El análisis de regresión dió por resultado un  $pK_a$  de  $7.05 \pm 0.03$ ,  $K_i = 70 \pm 5$  mM,  $n = 1.5 \pm 0.1$ , y  $m = 2.1 \pm 0.3$ ; siendo la suma de los cuadrados de las desviaciones  $2.4 \times 10^5$ . -

Keller y Parsons (1998b) demostraron la existencia de una histidina ( $pK_a=7.1$ ) en el sitio de enlace del vesamicol, cuya protonación inhabilita al TVA para captar vesamicol. Esta observación coincide con los resultados del modelo aquí presentado, donde se consideró que la especie protonada TVA  $H^+$  no puede captar [ $^3H$ ]vesamicol y el valor del  $pK_a$  estimado fue de 7.05. Es muy probable entonces, que el equilibrio de protonación descrito corresponda a la protonación de la histidina presente en el sitio de enlace del vesamicol.

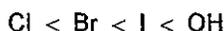
La introducción de los coeficientes de Hill  $n$  y  $m$  fue justificada estadísticamente y mejoró significativamente la simulación de los datos experimentales. Cuando un coeficiente de Hill positivo se encuentra asociado a un equilibrio, la reacción o proceso involucrado es de naturaleza cooperativa positivamente. En este caso, el modelo sugiere que la protonación de la histidina del TVA es un proceso cooperativo, y que la coordinación de TVA con yoduro también es cooperativa cuando la histidina en el sitio de enlace del vesamicol se encuentra protonada. El mecanismo de la inhibición se desconoce, pero resulta evidente que la interacción del yoduro con el TVA se encuentra íntimamente relacionada con el sitio de enlace del vesamicol.

Los resultados del estudio de competencia [ $^3H$ ]vesamicol-yoduro son muy importantes, puesto que ésta es la segunda ocasión en que se detectan interacciones del TVA con aniones. Anderson et al. (1983b) han encontrado que aniones como el tetrafenilborato inhiben el transporte activo de acetilcolina tritiada, sin embargo, el mecanismo de la inhibición se desconoce. El experimento de competencia [ $^3H$ ]vesamicol - yoduro presenta una evidencia clara de que existen interacciones entre el TVA y el yoduro, y que dichas interacciones afectan al sitio de enlace del vesamicol

Estas observaciones sugieren la presencia de un sitio de enlace para aniones en el TVA, que se encuentra relacionado con los sitios de enlace de la acetilcolina y el vesamicol. La coordinación de aniones con el TVA podría ser un mecanismo de regulación del transporte de acetilcolina, y por tanto, la caracterización de las interacciones del TVA con aniones será uno de los principales objetivos de investigaciones futuras

### VI.3. Estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS

En la literatura no se han reportado las constantes de los equilibrios en disolución del iodoMBS. Sólo se conocen las constantes de disociación de los halogenuros del metilmercurio (Simpson, 1961), las cuales indican que la estabilidad del enlace mercurio - halógeno aumenta según:



y 0.155 es el valor estimado para la constante del equilibrio:

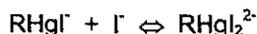


(Ec. 5)

Los equilibrios que pueden estar involucrados en las titulaciones del hidroximBS con yoduro son:



(Ec. 6)



(Ec. 7)

donde  $\text{RHgOH}^-$  corresponde al hidroximBS,  $\text{RHgI}^-$  al iodoMBS, y  $\text{RHgI}_2^{2-}$  representa a la especie organomercurada coordinada con dos yoduros. Las constantes relacionadas a estos equilibrios son: la constante del equilibrio entre el hidroximBS y el iodoMBS ( $K_{\text{OH-I}}$ ), y la constante de disociación del complejo  $\text{RHgI}_2^{2-}$  ( $K_2$ ). Para determinar si un segundo yoduro se coordina al mercurio, se realizaron titulaciones por RMP y potenciometría, cuyos resultados se discuten a continuación.

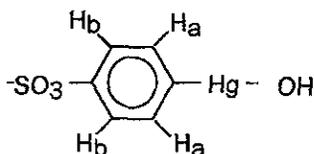
### Titulación potenciométrica

En la titulación potenciométrica del hidroximBS con KI (figura 5.11), el pH incrementó inmediatamente al adicionar KI. Un modelo matemático, basado en los balances de masa y electroneutralidad de los equilibrios descritos en las ecuaciones 6 y 7, fue ajustado a los datos experimentales. Los valores estimados para las constantes fueron:  $K_{\text{OH}} = 0.096 \pm 0.003$  y  $K_2 = 10 \pm 3$  mM.

El valor estimado para la constante  $K_{\text{OH}}$  es cercano al valor de la constante del equilibrio análogo con la especie metilmercurio (0.155), lo cual sugiere que el mercuriobencensulfonato se comporta análogamente al metilmercurio, en lo que respecta a su coordinación con hidróxido y halogenuros.

### Estudios de resonancia magnética protónica (RMP)

El punto de enfoque para analizar los espectros de RMP fue la región aromática que abarca desplazamientos químicos de 6.5 a 8.2 ppm. El espectro de RMP de la especie hidroximBS presenta en la región aromática dos dobletes que corresponden a los dos tipos de protones presentes en la molécula: dos hidrógenos  $H_a$  en posición orto al mercurio, y dos hidrógenos  $H_b$  en posición orto al grupo sulfonato (figura 6.1).



**Figura 6.1.** Estructura de la especie p-hidroximercuriobencensulfonato (hidroximBS). Cuatro hidrógenos, dos  $H_a$  y dos  $H_b$ , presentan dos dobletes en la región aromática del espectro

En la titulación realizada con KI a pD 7.0 se observó el surgimiento de otro par de dobletes (C y D), lo cual demuestra la formación de una nueva especie. A partir de las integraciones de los dobletes C y D, se determinó que la constante de disociación de la nueva especie es  $11 \pm 2$  mM.

Los dobletes C y D fueron asignados a la especie  $\text{RHgl}_2^{2-}$ , mientras que los dobletes A y B fueron asignados conjuntamente al iodoMBS y al hidroximBS. A continuación se discuten las observaciones que soportan dicha asignación.

En los estudios de pH, no se observaron cambios en las integraciones de los dobletes A, B, C y D al variar el nivel de acidez. Esto significa que el equilibrio entre la especie que genera los dobletes A y B, y la especie que genera los dobletes C y D no depende del nivel de acidez, como es el caso del equilibrio entre las especies  $\text{RHgl}^-$  y  $\text{RHgl}_2^{2-}$  (ec. 7).

De acuerdo a la constante  $K_{\text{OH}}$  determinada por la titulación potenciométrica, la sustitución del hidróxido por yoduro (ec. 6) es muy favorecida cuando el pH se encuentra amortiguado en 7.0. Por ejemplo, cuando se mezcla hidroximBS 1 mM con KI 1 mM, a pH 7.0 (amortiguado), se desplaza el 97% del hidróxido, es decir, se forma iodoMBS en concentración 0.97 mM. La titulación por RMP fue realizada a pH controlado (7.0); por tanto, desde concentraciones tan pequeñas como 1 mM, los dobletes A y B representan a la especie iodoMBS, dado que prácticamente todo el hidróxido ha sido sustituido por yoduro.

Por último, el valor de la constante de disociación  $K_2$  estimado por la titulación potenciométrica ( $10 \pm 3$  mM) coincide con el valor estimado por el estudio de RMP ( $11 \pm 2$  mM). La titulación potenciométrica y los estudios de RMN demuestran entonces que, efectivamente el yoduro se coordina con el iodoMBS para formar a la especie  $\text{RHgl}_2^{2-}$ , cuya constante de disociación es  $K_2 = 11 \pm 2$  mM

Esta información es muy importante, ya que los compuestos organomercurados, como el iodoMBS, son reactivos ampliamente usados en los estudios de modificación química de proteínas; conocer sus equilibrios en disolución puede ser de gran utilidad para la comprensión del comportamiento del sistema en estudio.

#### VI.4. Modelo de las interacciones TVA - iodoMBS – yoduro

A partir del estudio de la reacción del TVA con el iodoMBS, el estudio de competencia del [<sup>3</sup>H]vesamicol con yoduro, y el estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS, es posible proponer un modelo que describa las interacciones entre el TVA, el iodoMBS y el yoduro. El modelo propuesto se muestra en la figura 6.2.

TVA(C1H,C2H,His) representa a la proteína intacta con la histidina crítica desprotonada. De acuerdo a los estudios de competencia [<sup>3</sup>H]vesamicol - yoduro, la especie TVA(C1H,C2H,His) participa en dos equilibrios, uno de ellos es la coordinación con yoduro para formar a la especie TVA(C1H,C2H,HisI<sup>-</sup>), cuya constante de disociación es  $K_i = 70 \pm 5 \text{ mM}$ . Por otro lado, el TVA(C1H,C2H,His) se protona para formar a la especie TVA(C1H,C2H,HisH<sup>+</sup>), el pKa asociado es  $7.05 \pm 0.03$  y la protonación es cooperativa con un coeficiente de Hill positivo:  $n = 1.5 \pm 0.1$ . A su vez, la especie protonada interacciona cooperativamente con el yoduro para dar lugar a la especie TVA(C1H,C2H,HisH<sup>+</sup>I<sup>-</sup>), la cual representa a la proteína protonada y coordinada al yoduro, la coordinación con yoduro es cooperativa con un coeficiente de Hill positivo:  $m = 2.1 \pm 0.3$ , y la constante de disociación  $K_i$  es  $70 \pm 5 \text{ mM}$ .

Los mismos equilibrios de protonación y coordinación con yoduro se proponen para las especies TVA(C1HgR,C2H,His) y TVA(C1HgR,C2HgR,His), las cuales representan a la proteína desprotonada modificada en la cisteína 1 con iodoMBS, y a la proteína desprotonada modificada en ambas cisteínas, respectivamente. Pese a que no se realizaron estudios de competencia [<sup>3</sup>H]vesamicol-yoduro con estas dos especies, el modelo supone que la modificación de las cisteínas 1 y 2 con iodoMBS no impide las reacciones de protonación y coordinación con yoduro.

De acuerdo con los estudios realizados en vesículas previamente modificadas con MTSM, el modelo propone que la proteína desprotonada TVA(C1H,C2H,His) sufre modificación irreversible con iodoMBS en la cisteína 1, formando a la especie TVA(C1HgR,C2H,His), la cual a su vez, se modifica con iodoMBS en la cisteína 2 dando lugar a la especie TVA(C1HgR,C2HgR,His), que representa a la proteína desprotonada y modificada con iodoMBS en ambas cisteínas. La modificación en la

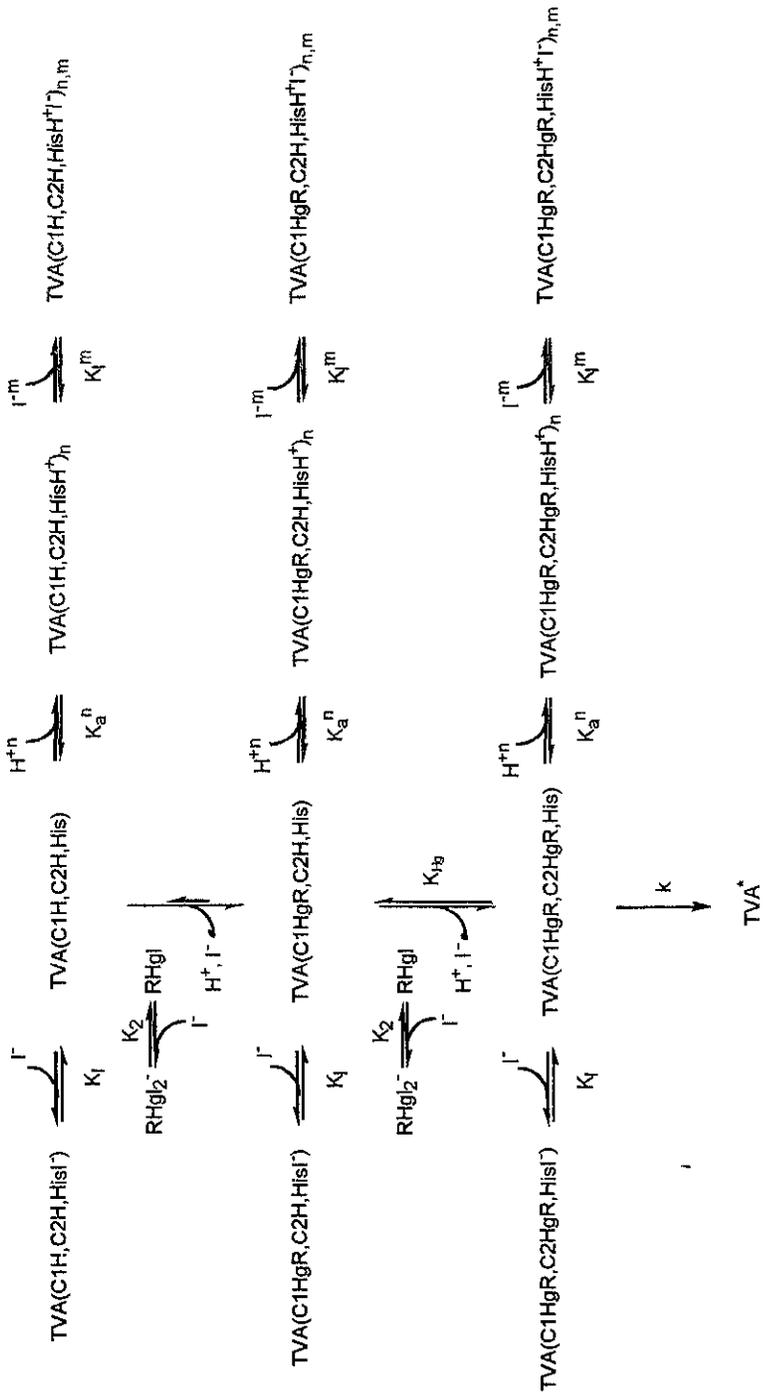


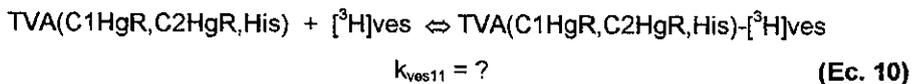
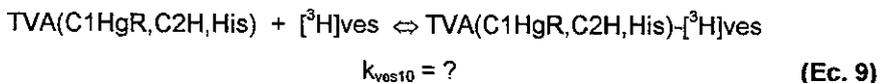
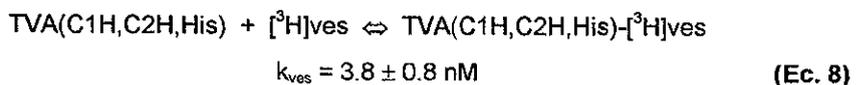
Figure 6.2

cisteína 2 sí es reversible y la constante asociada al equilibrio se simboliza como  $K_{Hg}$ , cuyo valor se desconoce.

Asociado a las modificaciones del TVA con iodoMBS, se encuentra el equilibrio de coordinación del yoduro con el iodoMBS para formar a la especie  $RHgI_2^{2-}$ , cuya constante de disociación es  $K_2 = 11 \pm 2$  mM. Cabe hacer notar que este equilibrio no es relevante en el caso de la modificación de la cisteína 1, dado que dicha modificación es irreversible; sin embargo, la formación de la especie  $RHgI_2^{2-}$  sí tiene un efecto en el equilibrio de la reacción de la cisteína 2 con el iodoMBS ( $RHgI$ ).

Finalmente, la proteína desprotonada y modificada con iodoMBS en ambas cisteínas,  $TVA(C1HgR,C2HgR,His)$ , decae exponencialmente con una constante de velocidad  $k = 0.26 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$  hacia una especie representada como  $TVA^*$ . Es importante hacer notar, que tratándose de una cinética de primer orden, la cantidad de proteína que se ha transformado en la especie  $TVA^*$  al tiempo  $t$ , depende de la concentración inicial de la especie  $TVA(C1HgR,C2HgR,His)$ , la cual a su vez es fijada por todos los equilibrios descritos en el modelo.

De todas las especies presentadas en el modelo, las únicas que pueden captar  $[^3H]$ vesamicol son:  $TVA(C1H,C2H,His)$ ,  $TVA(C1HgR,C2H,His)$ , y  $TVA(C1HgR,C2HgR,His)$ . Los equilibrios de captación de  $[^3H]$ vesamicol por estas especies, y las constantes de disociación correspondientes son:



Del trabajo de Keller y Parsons (1998a) se sabe que la constante de disociación para el equilibrio con la proteína intacta desprotonada ( $k_{ves}$ ) es  $3.8 \pm 0.8$  nM; sin embargo, se desconocen las constantes de disociación del  $[^3H]$ vesamicol con las otras dos especies ( $k_{ves10}$  y  $k_{ves11}$ ).

El modelo aquí propuesto trata de conceptualizar las interacciones entre el TVA, el iodoMBS y el yoduro que ocurren en el tubo de ensayo antes de realizarse el ensayo de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol en el filtro. Al filtrar la suspensión vesicular y lavarla con solución amortiguadora de titulación, el pH en el filtro es 7.8, las especies protonadas se desprotonan y el yoduro coordinado se pierde; el único enlace que se conserva es el enlace azufre-mercurio en las cisteínas modificadas con iodoMBS. Es decir, que los equilibrios arriba descritos ocurren en el tubo de ensayo, y fijan la distribución del TVA entre las especies TVA(C1H,C2H,His), TVA(C1HgR,C2H,His), y TVA(C1HgR,C2HgR,His), que son las que captan [<sup>3</sup>H]vesamicol en el filtro.

A partir de los equilibrios descritos, se construyó un modelo matemático que fue ajustado a los datos experimentales del estudio de pH realizado a diferentes concentraciones de iodoMBS (figura 5.5). En el modelo fueron insertados los valores de todas las constantes de equilibrio conocidas, mientras que  $K_{Hg}$ ,  $k_{ves10}$  y  $k_{ves11}$  fueron las únicas incógnitas del modelo. El modelo fue ajustado satisfactoriamente a los datos experimentales y las constantes determinadas fueron:  $K_{Hg} = 488 \pm 128 \text{ M}^{-1}$ ,  $k_{ves10} = 45 \pm 40 \text{ nM}$  y  $k_{ves11} = 7 \pm 2 \text{ } \mu\text{M}$ . El valor obtenido para la constante  $K_{Hg}$  es cercano al valor estimado para el equilibrio análogo con la especie metilmercurio (Simpson, 1961), lo cual apoya la hipótesis de que los equilibrios en disolución del mercuriobencensulfonato son similares a los del metilmercurio.

La constante  $k_{ves10}$  se encuentra indeterminada, sin embargo, se sabe que su valor debe ser mucho menor al de la constante  $k_{ves11}$ , dado que la especie TVA(C1HgR,C2H,His) puede captar más [<sup>3</sup>H]vesamicol que la especie TVA(C1HgR,C2HgR,His). El valor obtenido para la constante  $k_{ves11}$  es razonable, ya que en presencia de [<sup>3</sup>H]vesamicol 400 nM, el porcentaje de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol por la especie TVA(C1HgR,C2HgR,His) es prácticamente cero, lo cual fue observado en los experimentos donde la reacción del TVA con iodoMBS fue completa.

Cada uno de los experimentos realizados contribuyeron para la construcción del modelo aquí presentado. Si se considera la diversidad de las técnicas y los tipos de experimentos realizados, es interesante el que un modelo pueda conjuntar todas las observaciones y ser ajustado satisfactoriamente a los resultados de uno de los

experimentos representativos del sistema en estudio. La simulación que el modelo hace de los datos experimentales la validez de las hipótesis e interpretaciones aquí discutidas.

La importancia del modelo propuesto no radica en la veracidad y precisión de los equilibrios descritos, sino en haber demostrado que es posible construir una imagen del sistema en estudio a partir de observaciones realizadas en diversos tipos de experimentos.

*Si es real la luz blanca  
de esta lámpara, real  
la mano que escribe, ¿son reales  
los ojos que miran lo escrito?*

*De una palabra a la otra  
lo que digo se desvanece.  
Yo sé que estoy vivo  
entre dos paréntesis.*

Octavio Paz

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

Mediante el uso de ensayos de captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol en vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*, se logró la caracterización de la reacción de las cisteínas críticas presentes en el TVA con la especie organomercurada iodoMBS. Los estudios revelaron que la presencia de altas concentraciones de yoduro desfavorecen la reacción de las cisteínas con el iodoMBS; mientras que, la fuerza iónica de la suspensión vesicular no tiene efecto alguno en la reacción.

Los estudios de modificación química del TVA con MTSM demostraron que la reacción de la cisteína 1 con iodoMBS es irreversible. Por el contrario, la reacción de la cisteína 2 con iodoMBS presenta un equilibrio, que es sensible a las concentraciones de yoduro, iodoMBS y protones. El efecto de estos últimos fue notable, la reacción de la cisteína 2 con iodoMBS se ve muy favorecida a valores de pH altos.

Así mismo, se observó que el TVA modificado en ambas cisteínas con iodoMBS sufre un proceso secundario de naturaleza desconocida, para dar lugar a una especie que ya no participa en los equilibrios con el yoduro y el iodoMBS.

Los equilibrios en disolución del iodoMBS en presencia de ión yoduro fueron caracterizados por estudios de potenciometría y resonancia magnética protónica. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que el mercuriobencensulfonato es análogo al metilmercurio en su coordinación con ión hidróxido y halogenuros. Así mismo, se demostró que un segundo yoduro se coordina con el iodoMBS para dar lugar a la especie  $\text{RHgI}_2^{2-}$ , cuya constante de disociación es del orden de 11 mM.

Por otro lado, los estudios de competencia directa [ $^3\text{H}$ ]vesamicol-yoduro en vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*, demostraron claramente que el ión yoduro interacciona con el TVA e inhibe la captación de [ $^3\text{H}$ ]vesamicol. Los resultados de este estudio sugieren la existencia de un sitio de enlace para aniones en el TVA.

Por último, en el presente trabajo se construyó un modelo a partir de todas las observaciones realizadas en el estudio de la reacción del TVA con iodoMBS, el estudio de competencia [ $^3\text{H}$ ]vesamicol-yoduro y el estudio de los equilibrios en disolución del iodoMBS. El modelo propuesto ayuda a la comprensión de las interacciones entre el TVA, el iodoMBS y el yoduro; y puede ser de gran utilidad para futuros estudios de modificación química del TVA con compuestos organomercurados.

## CAPÍTULO VIII

### REFERENCIAS

- Alfonso A., Grundahl K., Duerr J. S., Han H. P. and Rand J. B. (1993) The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* **261**, 617-619.
- Anderson D. C., King S. C. and Parsons S. M. (1983a) Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified *Torpedo* electric organ synaptic vesicles. *Mol. Pharmacol.* **24**, 48-54.
- Anderson D. C., King S. C. and Parsons S. M. (1983b) Inhibition of [<sup>3</sup>H]acetylcholine active transport by tetraphenylborate and other anions. *Mol. Pharmacol.* **24**, 55-59.
- Bahr B. A., Clarkson E. D., Rogers G. A., Noremborg K. and Parsons S. M. (1992) A kinetic and allosteric model for the acetylcholine transporter - vesamicol receptor in synaptic vesicles. *Biochemistry* **31**, 5752-5762.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Carlson S. S., Wagner J. A. and Kelly R. B. (1978) Purification of synaptic vesicles from elasmobranch electric organ and the use of biophysical criteria to demonstrate purity. *Biochemistry* **17**, 1188-1199.
- Clarkson E. D., Rogers G. A. and Parsons S. M. (1992) Binding and active transport of large analogues of acetylcholine by cholinergic synaptic vesicles *in vitro*. *J. Neurochem.* **59**, 695-700.
- Dunant Y. and Israel M. (1985) The release of acetylcholine. *Sci. Am.* **252**, 58-66.
- Dunant Y. and Muller D. (1986) Quantal release of acetylcholine evoked by focal depolarization at the *Torpedo* nerve-electroplaque junction. *J. Physiol. (London)* **379**, 461-478.

- Erickson J. D., Varoqui H., Schafer M. K., Modi W., Diebler M. F., Weihe E., Rand J., Eiden L. E., Bonner T. I. and Usdin T. B. (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J. Biol. Chem.* **269**, 21929-21932.
- Erickson J. D., Weihe E., Schafer M. K., Neale E., Williamson L., Bonner T. I., Tao-Cheng J. H. and Eiden L. E. (1996) The VACht/ChAT "cholinergic gene locus": new aspects of genetic and vesicular regulation of cholinergic function. *Prog. Brain Res.* **109**, 69-82.
- Gracz L. M. and Parsons S. M. (1996) Purification of active synaptic vesicles from the electric organ of *Torpedo californica* and comparison to reserve vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1292**, 293-302.
- Jahn R. and Sudhof T. C. (1993) Synaptic vesicle traffic: rush hour in the nerve terminal. *J. Neurochem.* **61**, 12-21.
- Kandel E.R. (1991) Nerve cells and behavior. In Kandel E. R., Schwartz J. H. and Jessell T. M. (eds). *Principles of Neural Science*. 3a. ed. Elsevier, E. U. A., 18-32.
- Kandel E. R., Siegelbaum S. A. and Schwartz J. H. (1991) Synaptic transmission. In Kandel E. R., Schwartz J. H. and Jessell T. M. (eds). *Principles of Neural Science*. 3a. ed. Elsevier, E. U. A., 123-134.
- Keller J. E. and Parsons S. M. (1998a) Vesamicol binding to the vesicular acetylcholine transporter of *Torpedo*: effects of mercury (II) and modification of cysteines with reagents of different sizes. *J. Neurochem.* Enviado para publicación.
- Keller J. E. and Parsons S. M. (1998b) Evidence that a histidine in the vesicular acetylcholine transporter of *Torpedo* is linked to the vesamicol binding site. *J. Neurochem.* Enviado para publicación.
- Keller J. E. and Parsons S. M. (1998c) Triangulation of an acetylcholine-vesamicol binding site with respect to two cysteines in the vesicular acetylcholine transporter of *Torpedo*. *J. Neurochem.* Enviado para publicación.

- Kornreich W. D. and Parsons S. M. (1988) Sidedness and chemical and kinetic properties of the vesamicol receptor of cholinergic synaptic vesicles. *Biochemistry* **27**, 5262-5267.
- Kuhar M. J. and Murrin L. C. (1978) Sodium-dependent, high affinity choline uptake. *J. Neurochem.* **30**, 15-21.
- Muller D. and Dunant Y. (1987) Spontaneous quantal and subquantal transmitter release at the *Torpedo* nerve-electroplaque junction. *Neuroscience* **20**, 911-921.
- Nagy A., Baker R. R., Morris S. J. and Whittaker V. P. (1976) The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Res.* **109**, 285-309.
- Nguyen M. L., Cox G. D. and Parsons S. M. (1998) Kinetics parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons exchange for one acetylcholine *J. Neurochem.* En prensa.
- Ohsawa K., Dowe G. H. C., Morris S. J. and Whittaker V. P. (1979) The lipid and protein content of cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of *Torpedo marmorata* purified to constant composition: implications for vesicle structure. *Brain Res.* **161**, 447-457.
- Parsons S. M. and Koenigsberger R. (1980) Specific stimulated uptake of acetylcholine by *Torpedo* electric organ synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 6234-6238.
- Parsons S. M., Prior C. and Marshall I.G. (1993) Acetylcholine transport, storage, and release. *Intl. Rev. Neurobiol.* **35**, 279-390.
- Rogers G. A., Parsons S. M., Anderson D. C., Nilsson L. M., Bahr B. A., Kornreich W. D., Kaufman R., Jacobs R. S. and Kirtman B. (1989) Synthesis, *in vitro* acetylcholine storage-blocking activities, and biological properties of derivatives and analogues of *trans*-2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol (vesamicol). *J. Med. Chem.* **32**, 1217-1230.
- Roghani A., Feldman J., Kohan S. A., Shirzadi A., Gundersen C. B., Brecha N. and Edwards R. H. (1994) Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10620-10624.

- Simpson R. B. (1961) Association constants of methylmercury with sulfhydryl and other bases. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4711-4717.
- Song H., Ming G., Fon E., Bellocchio E., Edwards R. H. and Poo M. (1997) Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron* **18**, 815-826.
- Usdin T. B., Eiden L. E., Bonner T. I. and Erickson J. D. (1995) Molecular biology of the vesicular ACh transporter. *Trends Neurosci.* **18**, 218-224.
- Varoqui H., Diebler M. F., Meunier F. M., Rand J. B., Usdin T. B., Bonner T. I., Eiden L. E. and Erickson J. D. (1994) Cloning and expression of the vesamicol binding protein from the marine ray *Torpedo*. Homology with the putative vesicular acetylcholine transporter UNC-17 from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **342**, 97-102.

## APÉNDICE

### Síntesis y marcaje radioactivo del vesamicol

La síntesis del vesamicol se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito (Rogers et al., 1989). En resumen, la síntesis involucró la adición del compuesto 4-fenilpiperidina al óxido de ciclohexeno en medio etanólico. El producto de la reacción fue una mezcla racémica de ( $\pm$ )-trans-2-(4-fenilpiperidino)ciclohexanol [( $\pm$ )-vesamicol], la cual fue resuelta utilizando el monohidrato del ácido (-)-di-p-toloudil-L-tartárico. Una vez aislado el isómero (-)-trans-2-(4-fenilpiperidino)ciclohexanol en forma de clorhidrato, la forma radioactiva fue preparada por reducción con  $^3\text{H}_2$  sobre 10% de un catalizador de paladio (Pd/C) en medio etanólico. La actividad del compuesto marcado ( $^3\text{H}$ )(-)-vesamicol fue determinada por espectrofotometría de masas y resultó ser 32.6 Ci/mmol (Rogers et al., 1989). La síntesis y marcaje del (-)-vesamicol fue realizada por el Dr. Gary Rogers y el Dr. Stanley Parsons. Para efectos del presente estudio, el trabajo experimental inició con la purificación del vesamicol tritiado.

### Purificación del vesamicol tritiado

Un mL del clorhidrato de  $^3\text{H}$ (-)-vesamicol impuro fue evaporado por centrifugación de alta velocidad al vacío. El producto fue suspendido en diclorometano, y se adicionó solución acuosa de NaOH 1 M para lograr la neutralización del clorhidrato. El  $^3\text{H}$ vesamicol neutralizado fue separado de la mezcla por extracciones sucesivas con diclorometano, y las fracciones colectadas fueron secadas con sulfato de sodio anhidro.

Una columna de cromatografía fue preparada con silica gel en diclorometano, y empacada en una pipeta Pasteur con fibra de vidrio en la parte inferior. Se adicionó hexano a la disolución del producto en diclorometano, y la mezcla se pasó por la columna, seguida de porciones de 5 mL de diclorometano con isopropanol en concentración creciente de 0 a 16% en volumen. Las fracciones fueron colectadas y

analizadas en un contador de centelleo, previa dilución 1:5000 en el líquido de centelleo. Las fracciones con el máximo contenido de tritio fueron colectadas, el diclorometano fue evaporado por burbujeo directo de nitrógeno en la disolución y el isopropanol fue evaporado por centrifugación de alta velocidad al vacío. El vesamicol tritado puro fue redisoluelto en disolución amortiguadora de titulación (glicina 0.7 M, HEPES 0.1 M, EDTA 1 mM y EGTA 1 mM, ajustada a pH 7.8 con NaOH), hasta una concentración de 0.4 mM (6 mCi/mL aprox.). La solución resultante fue almacenada a 4°C para su uso posterior.

### **Aislamiento y purificación de las vesículas sinápticas VP<sub>1</sub>**

Las vesículas sinápticas VP<sub>1</sub> fueron aisladas del órgano eléctrico del pez *Torpedo California*, de acuerdo al protocolo descrito por Gracz y Parsons (1996). Los peces vivos fueron obtenidos de pescadores locales en la zona de Santa Barbara, California, y colocados en tanques con agua de mar previamente filtrada. Durante 3 o 5 días, los peces fueron conservados en ese lugar para lograr su recuperación de la captura. Posteriormente, los peces fueron colectados y disectados para extraer los órganos eléctricos, los cuales fueron inmediatamente congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -90°C.

Cada vez que una preparación de vesículas sinápticas VP<sub>1</sub> era requerida, 400 g. del órgano eléctrico congelado fueron tratados de acuerdo al protocolo descrito por Gracz y Parsons (1996). En resumen, el procedimiento incluyó homogeneización del tejido, separación por centrifugación con gradiente de sacarosa y Ficoll, y equilibrio de las bandas formadas en el gradiente de densidad. La banda correspondiente a las vesículas sinápticas VP<sub>1</sub> fue separada y adicionada a una columna de cromatografía de exclusión molecular, empacada con gel Sephacryl S-1000. La columna fue alimentada con solución amortiguadora de columna (glicina 0.78 M, HEPES 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, y NaN<sub>3</sub> al 0.01%, ajustada a pH 7.0 con KOH), y las fracciones de eluyente fueron analizadas por espectrofotometría a 340 nm para la identificación y colección de aquellas fracciones que contenían a las vesículas sinápticas VP<sub>1</sub>.

purificadas. La preparación obtenida fue concentrada hasta 2 o 3 mg de proteína por mL de solución, utilizando dispositivos de ultrafiltración centrífuga Centricon (Amicon Corporation)

El trabajo de aislamiento y purificación de las vesículas sinápticas fue realizado por la laboratorista Laura Polacco; las preparaciones obtenidas fueron el punto de partida para los experimentos realizados.

### Ensayo de Bradford

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El reactivo de Bradford fue preparado de acuerdo al protocolo descrito por Bradford (1976). 100 mg del colorante Azul de Coomassie fueron disueltos en 50 mL de etanol al 95%, y 100 mL de una disolución de ácido fosfórico al 85% (peso en volumen) fueron añadidos. La disolución resultante fue diluida hasta un volumen final de un litro, y almacenada a 4°C para su uso en cada ensayo de Bradford.

Para determinar la concentración de proteínas en cada preparación de vesículas sinápticas se preparó una curva estándar a partir de una disolución concentrada de albúmina sérica bovina (0.5 mg/mL) en solución amortiguadora de columna (glicina 0.78 M, HEPES 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, y  $\text{NaN}_3$  al 0.01%, ajustada a pH 7.8 con KOH). Varias disoluciones estándar que contenían de 0 a 15  $\mu\text{g}$  de proteína en 5 mL del reactivo de Bradford fueron preparadas. Por otro lado una muestra con 5  $\mu\text{L}$  de la preparación de vesículas sinápticas en 5 mL del reactivo de Bradford fue preparada por triplicado.

La absorbancia de las muestras fue medida a 595 nm 10 minutos después de haber mezclado los reactivos. Las absorbancias medidas fueron graficadas en función de la cantidad de proteína contenida en cada estándar, y analizadas por regresión lineal. La concentración de proteína en las preparaciones de vesículas sinápticas fueron determinadas a partir de la curva de calibración.

Cuatro diferentes preparaciones de vesículas sinápticas  $\text{VP}_1$  fueron utilizadas a lo largo del presente estudio, y para cada una de ellas se realizó un ensayo de Bradford.

### **Preparación de los filtros**

Los filtros utilizados para los ensayos de captación de [<sup>3</sup>H]vesamicol fueron filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F con poros de 0.7 μm de diámetro, previamente recubiertos con polietilenimina. Los filtros fueron suspendidos en una disolución acuosa del polímero al 0.5% por tres horas, lavados con agua destilada, y secados en una estufa por varias horas.

### **Conversión de cpm a pmol/mg**

Los datos fueron convertidos a unidades de picomol de [<sup>3</sup>H]vesamicol captado por miligramo de proteína (pmol/mg). La conversión de cpm a pmol/mg fue realizada tomando en cuenta los siguientes datos y conversiones: (1) la eficiencia del contador de centelleo líquido fue 44%, (2) la conversión de cpm a curie es  $1 \text{ mCi} = 2.2 \times 10^9 \text{ cpm}$ , (3) la actividad del vesamicol tritiado al tiempo del presente estudio fue 15 Ci/mmol, y (4) la cantidad de proteína filtrada fue 2.7 μg (90 μL de suspensión vesicular 30 μg/mL).

## ABREVIATURAS

ATP	trifosfato de adenosina
cloroMBS	p-cloromercuriobencensulfonato
cpm	cuentas por minuto
EDTA	ácido etilediaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminoetiléter)-N,N'- tetraacético
GTP	trifosfato de guanidina
HEPES	ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
hidroxiMBS	p-hidroximercuriobencensulfonato
iodoMBS	p-iodomercuriobencensulfonato
MES	ácido 2-[N-morfolin]etanosulfónico
RMP	resonancia magnética protónica
MTSM	metantiosulfonato de S-metilo
TVA	transportador vesicular de acetilcolina

*Es el tiempo que perdiste por tu rosa  
lo que la hace ser tan importante.*

El zorro, amigo de El Principito