

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



**“Modulación de receptores nicotínicos neuronales por
la combinación de imipramina y mecamilamina”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

Q. F. B. GRISELDA CASAS PRUNEDA

DIRIGIDA POR:

DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA

Juriquilla, Querétaro, Qro.

México 2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. José Jesús García Colunga. Se recibió apoyo del proyecto CONACYT C02-44015. Además se contó con el apoyo de una beca de CONACYT con número de registro 181285 y una beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México con número de cuenta 504005837.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial al Instituto de Neurobiología, por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. José Jesús García Colunga, por ser un excelente tutor y por ofrecerme su apoyo y comprensión en todo momento. Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo en un ambiente sano y disciplinado. Por brindarme su amistad y sobre todo por guiarme en el camino de la ciencia.

A los integrantes de mi Comité Tutorial, Dra. Carmen Aceves Velasco, Dr. Miguel Condés Lara y Dr. José Jesús García Colunga, por sus valiosas observaciones y sugerencias en cada examen tutorial; por motivarme a dar siempre el máximo.

A los integrantes del Jurado, Dr. Michael Jeziorski, Dr. Javier Velásquez Moctezuma, Dr. Miguel Condés Lara, Dr. León Cintra McGleone y Dr. José Jesús García Colunga por sus comentarios y sugerencias en el escrito de tesis.

A Elizabeth Vázquez, por instruirme en las técnicas de laboratorio necesarias para la realización de mi tesis y por su gran amistad.

Al MVZ. Martín García Servín, por el cuidado de las ranas *Xenopus laevis* del laboratorio.

A la Quim. Leonor Casanova Rico, por su valiosa ayuda al realizar todo trámite administrativo gustosa y eficientemente; y a sus colaboradoras en la unidad de enseñanza Yolanda y Carmen. A todo el equipo administrativo y de biblioteca, Pilar Galarza Barrios.

A todos aquellos investigadores que compartieron sus conocimientos en cada clase impartida.

Al Dr. Miguel Condés Lara por su valioso apoyo, sus consejos y por su amistad.

A mis compañeros de maestría, Yunuen, Susana, Nuri, Miriam Z, Fabiola, Verónica, Jesús, Gustavo y Carlos, por los momentos compartidos en este camino, por su apoyo académico y por su amistad.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Miriam, Elizabeth, Berenice, Clara, Marcelino, Ulises, Daniel, Efrén y Jorge, por sus sugerencias en este proyecto y por los momentos tan gratos compartidos. A mis amigos del instituto, Tere, Itzel, Wilbert, Estuardo, Carlos, Joel y Luis por las emociones vividas y por la dicha de haberlos conocido.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por el apoyo económico para realizar una estancia de investigación en la Universidad de Utah, Salt Lake City, EUA y al Dr. Baldomero Olivera por recibirme en su laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado por el apoyo económico para la realización de mi maestría.

DEDICATORIAS

A mis padres Genaro y Rosa Irma a los cuales debo admiración y respeto, por el gran apoyo y cariño incondicional que me han brindado.

A ti mamá que has sido una madre extraordinaria. Gracias por ser tan realista y mantenerme con los pies sobre la tierra en todo momento. Eres mi más grande apoyo, mi fortaleza. Pero sobre todo gracias por tu cariño, comprensión y por ayudarme a salir adelante en momentos difíciles.

A ti papá por ser un padre excelente siempre pendiente de la familia. Gracias por todo el apoyo que me has dado y sobre todo por confiar en mí. Se que fue difícil estar lejos, pero al final de todo, valió la pena! Gracias por hacerme sentir tan querida y especial, por permitirme seguir siendo tu niña.

A Víctor e Israel que además de ser mis hermanos son mis amigos. Víctor gracias por los momentos que hemos compartido, por tu alegría, tu cariño y por darme tu apoyo a pesar de mis ausencias. Isra, gracias por todos tus detalles, cuidados y por escucharme cuando lo necesito.

A ti David, por tu paciencia, perseverancia y apoyo. Gracias por todos los momentos que hemos compartido, por ser parte de mi vida y sobre todo por tu amor.

A toda mi familia Casas, Ruiz-Hernández y Pruneda-Guevara que me han brindado su apoyo y cariño durante toda mi vida. A ti abue por tu rezos y muestras de afecto.

A mis amigas del alma Arianda, Marianela, Mónica, Mary, Sandra y Carolina por ser mis confidentes y por su apoyo en las buenas y en las malas. A mis amigos Mario, Gerardo, Toño y Luis por su gran amistad.

A la vida por permitirme existir y alcanzar mis metas!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	9
RECEPTORES NICOTÍNICOS (R-nic)	9
Generalidades	9
Estructura y función de los R-nic	9
Distribución de los R-nic neuronales	13
Funciones de los R-nic en el sistema nervioso y su relación con algunas patologías	15
DEPRESIÓN	17
HIPÓTESIS DE LA DEPRESIÓN	18
LOS R-nic Y LA DEPRESIÓN	20
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
OBTENCIÓN DE ARN CODIFICANTE PARA CADA SUBUNIDAD DEL R-nic	30
Bacterias TB1 calcio competentes	31
Transformación de bacterias con plasmido y cultivo	31
Siembra de colonias en medio LB líquido para realizar MAXIPREPS	32
Obtención de ADN plasmídico mediante MAXIPREPS (purificación de ADN)	32
Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro	34
Linearización de ADN con enzimas de restricción	35
Purificación de ADN linearizado por el método de extracción fenol-cloroformo	36
Trascrición in vitro	37
Purificación de ARN por el método de extracción fenol-cloroformo	38

Cuantificación de ARN en el espectrofotómetro	38
EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	39
Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> como modelo para el estudio de receptores	39
Preparación de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> para microinyección	39
Inyección de ovocitos <i>Xenopus</i>	41
REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	42
Fundamentos de la técnica de fijación de voltaje	42
Registro electrofisiológico de ovocitos inyectados	42
VII. RESULTADOS	44
Corriente iónica en función de la concentración de nicotina	44
Efecto de la mecamilamina en las corrientes activadas por nicotina	47
Relación concentración de mecamilamina vs efecto	48
Recuperación de la inhibición de mecamilamina	50
Mecamilamina como antagonista no-competitivo	52
Efecto de la imipramina en corrientes activadas por nicotina	55
Relación concentración de imipramina vs efecto	56
Imipramina como antagonista no-competitivo	58
Comparación de la potencia inhibitoria entre mecamilamina e imipramina	60
Efecto de la combinación de mecamilamina e imipramina sobre las corrientes activadas por nicotina	62
Efectos en función del voltaje de membrana	67
VIII. DISCUSIÓN	75
IX. RESUMEN DE RESULTADOS	83
X. CONCLUSIONES	84
XI. REFERENCIAS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura del R-nic muscular.	10
Fig. 2. Regiones transmembranales de las subunidades del R-nic.	11
Fig. 3. Puentes disulfuro en distintos tipos de receptores ionotrópicos.	12
Fig. 4. Distribución de R-nic en el cerebro de la rata.	14
Fig. 5. Estructura química de la nicotina.	21
Fig. 6. Estructura química de la mecamilamina.	22
Fig. 7. Estructura química de la imipramina.	25
Fig. 8. Rana <i>Xenopus laevis</i> adulta.	40
Fig. 9. Disección de la rana, obtención de lóbulos y separación de ovocitos.	41
Fig. 10. Relación concentración de nicotina vs efecto.	46
Fig. 11. Corrientes iónicas inducidas por AcCo y por nicotina.	47
Fig. 12. Efecto inhibitorio de la mecamilamina.	48
Fig. 13. Bloqueo de la respuesta por mecamilamina en función de su concentración.	50
Fig. 14. Tiempo de recuperación de la corriente inhibida por mecamilamina.	52
Fig. 15. Mecamilamina como antagonista no-competitivo de los R-nic.	54
Fig. 16. Efecto inhibitorio de la imipramina.	56
Fig. 17. Bloqueo de la respuesta por imipramina en función de su concentración.	57
Fig. 18. Imipramina como antagonista no-competitivo de los R-nic.	59
Fig. 19. Comparación de las relaciones de concentración vs efecto para mecamilamina e imipramina.	61
Fig. 20. Efecto de la combinación de mecamilamina e imipramina sobre las corrientes activadas por nicotina.	63
Fig. 21. Efecto de la mecamilamina en R-nic inhibidos por imipramina.	64
Fig. 22. Aumento de la concentración de mecamilamina sobre el efecto de la imipramina.	66

Fig. 23. Efectos de mecamilamina y la combinación de mecamilamina e imipramina en función del potencial de membrana.	68
Fig. 24. Relación corriente-voltaje en presencia de mecamilamina y la combinación de mecamilamina e imipramina.	69
Fig. 25. Dependencia de la corriente en función del voltaje.	71
Fig. 26. Efectos de imipramina y la combinación de imipramina y mecamilamina en función del potencial de membrana.	72
Fig. 27. Relación corriente-voltaje en presencia de imipramina y la combinación de imipramina y mecamilamina.	73
Fig. 28. Dependencia de la corriente en función del voltaje.	74

ABREVIATURAS

Acetilcolina	AcCo
Ácido desoxi ribonucleico	ADN
Ácido gama aminobutirico	GABA
Ácido ribonucleico	ARN
Concentración efectiva cincuenta	EC₅₀
Concentración inhibitoria cincuenta	IC₅₀
Dopamina	DA
Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina	ISRS
Monoaminoxidasa	MAO
Norepinefrina	NE
Receptores nicotínicos	R-nic
Serotonina	5-HT
Sistema nervioso central	SNC

RESUMEN

Al parecer uno de los mecanismos de acción comunes de fármacos con efecto antidepresivo es inhibir a los receptores nicotínicos (R-nic). Se ha visto que al co-administrar inhibidores de R-nic con antidepresivos se presenta un sinergismo en modelos conductuales de depresión. Así, se planteó la hipótesis que al combinar el antagonista de R-nic mecamilamina con el antidepresivo imipramina, se presenta un efecto sinérgico inhibitorio sobre los R-nic. Para ello se estudiaron las respuestas eléctricas activadas por nicotina en ovocitos que expresaban R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$.

La nicotina tuvo su efecto máximo con 100 μM y su concentración efectiva cincuenta fue $50 \pm 13.68 \mu\text{M}$. Las concentraciones inhibitorias cincuenta para mecamilamina e imipramina fueron $12.2 \pm 2.1 \text{ nM}$ y $1.16 \pm 0.26 \mu\text{M}$, respectivamente. El efecto de la mecamilamina no depende del voltaje de membrana, mientras que el efecto de la imipramina depende ligeramente del mismo, calculándose una distancia eléctrica de ~ 0.06 y ~ 0.09 , respectivamente, lo que indica que el sitio de unión de ambas es muy cercano a la entrada del canal iónico. Se encontró que la combinación de mecamilamina e imipramina no tiene un efecto inhibitorio sinérgico y compiten entre ellas por el mismo sitio de unión en el R-nic.

Dado que no se observó el sinergismo esperado, se piensa que para que éste se lleve a cabo a nivel conductual, es necesaria la contribución de otros sistemas en los que participen más receptores a neurotransmisores, canales iónicos activados por voltaje y/o transportadores a neurotransmisores.

I. INTRODUCCIÓN

Los R-nic pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos activados por ligando. Son receptores a sustancias químicas que median la transmisión sináptica en el sistema nervioso, y juegan un papel muy importante en la liberación de distintos neurotransmisores. Los R-nic están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso y desempeñan funciones motoras y cognoscitivas, como la atención y la memoria. Asimismo, se han asociado con distintas patologías, como la esquizofrenia, y desórdenes en el estado de ánimo como la depresión.

Existen diversas hipótesis para explicar la etiología de la depresión. Una de las cuales plantea que durante la depresión el sistema colinérgico, al cual pertenecen los R-nic, está sobreactivado. Se sabe que distintos fármacos antidepresivos producen un efecto inhibitorio de las respuestas activadas por acetilcolina (AcCo) en distintos subtipos de R-nic. Tales resultados apoyan la hipótesis colinérgica de la depresión.

Por otro lado, se ha observado en modelos conductuales de depresión que antagonistas nicotínicos como la mecamilamina y la dihidro- β -eritroidina, potencian el efecto antidepresivo que tiene la imipramina y el citalopram.

Este estudio es de particular interés ya que se postula que existe un sinergismo entre antagonistas de R-nic y antidepresivos. Una posibilidad, dado que ambos tipos de sustancias son inhibidores de R-nic, es que la interacción de ambas sustancias con los R-nic es lo que ocasiona el efecto sinérgico antidepresivo observado. Sin embargo, no existen trabajos en los que se haya estudiado la modulación de los R-nic por la combinación de sustancias como la mecamilamina y la imipramina, las cuales han mostrado efectos antidepresivos.

Es por ello que en este proyecto estudiamos la modulación de los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$, por la combinación de mecamilamina e imipramina, con la finalidad de evaluar si el efecto sinérgico observado entre estas dos sustancias, en los modelos conductuales de depresión, pudiera ser el producto del efecto inhibitorio sinérgico entre ambas sustancias sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$. Para ello se estudiaron las corrientes eléctricas inducidas por nicotina, sobre R-nic $\alpha 4\beta 4$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* de manera heteróloga, mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.

Los resultados mostraron que la combinación de mecamilamina e imipramina no induce un efecto inhibitorio sinérgico sobre las corrientes iónicas inducidas con nicotina, sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$.

II. ANTECEDENTES

RECEPTORES NICOTÍNICOS (R-nic)

Generalidades

Los receptores para acetilcolina nicotínicos pertenecen a la familia de receptores ionotrópicos activados por ligando, dentro de la cual se incluyen los receptores para ácido γ -aminobutírico (GABA) tipos A y C, glicina y 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) tipo 3 (Changeux, 1990).

El nombre de R-nic fue dado por Sir Henry Dale al observar que la acción de la AcCo era mimetizada por un alcaloide encontrado en la planta *Nicotiana tabacum*, llamado nicotina (Dale, 1914, en: Paton, 1976).

El R-nic muscular fue el primer tipo de receptor a neurotransmisores caracterizado funcionalmente (En: Unwin, 2003). El estudio del R-nic muscular ha sido de gran importancia para definir las propiedades no sólo del R-nic, sino también de una gran familia de receptores activados por ligando (Unwin, 1998). Los experimentos electrofisiológicos en la placa neuromuscular de anfibios y mamíferos realizados por Katz y colaboradores entre los años 50's y 70's, ayudaron a explicar los principios básicos de la transmisión sináptica, la liberación cuántica de los neurotransmisores, la desensibilización de los receptores y el análisis del ruido sináptico en eventos de receptores individuales (Fatt y Katz, 1952; Katz y Thesleff, 1957; Katz y Miledi, 1965, 1969 y 1972).

Estructura y función de los R-nic

El R-nic muscular está constituido por cinco subunidades polipeptídicas cada una con un peso molecular entre 40 y 65 kDa (Figura 1). Las subunidades son designadas como alfa (α), beta (β), gama (γ) y delta (δ) en el embrión o épsilon (ϵ) en el adulto, y se combinan con una estequiometría de dos subunidades α , una β , una γ y una δ ó ϵ , que en conjunto forman un R-nic de aproximadamente 290 kDa (Kubalek et al., 1987).

Las subunidades de la familia de receptores ionotrópicos presentan tres dominios bien diferenciados: uno extracelular hidrofílico, otro transmembranal hidrofóbico y otro intracelular hidrofílico. Asimismo, cada subunidad tiene cuatro regiones que atraviesan la membrana lipídica, denominadas: TM1, TM2, TM3 y TM4 (Lukas et al., 2002). Los

aminoácidos que forman la región TM2 de cada subunidad, al parecer forman la pared del poro o canal iónico; el cual en estado cerrado mide menos de 2 Å, mientras que en estado abierto es aproximadamente de 6 Å (Sankararamakrishnan et al., 1996). Los aminoácidos que constituyen la región TM2 están arreglados de tal manera que forman tres anillos, cuyas cargas negativas están orientadas hacia el interior del canal. Estos anillos parecen aportar gran parte de la selectividad al paso de cationes (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), mientras que los aniones son excluidos por repulsión electrostática (Wang et al., 1992; Dani, 1993).

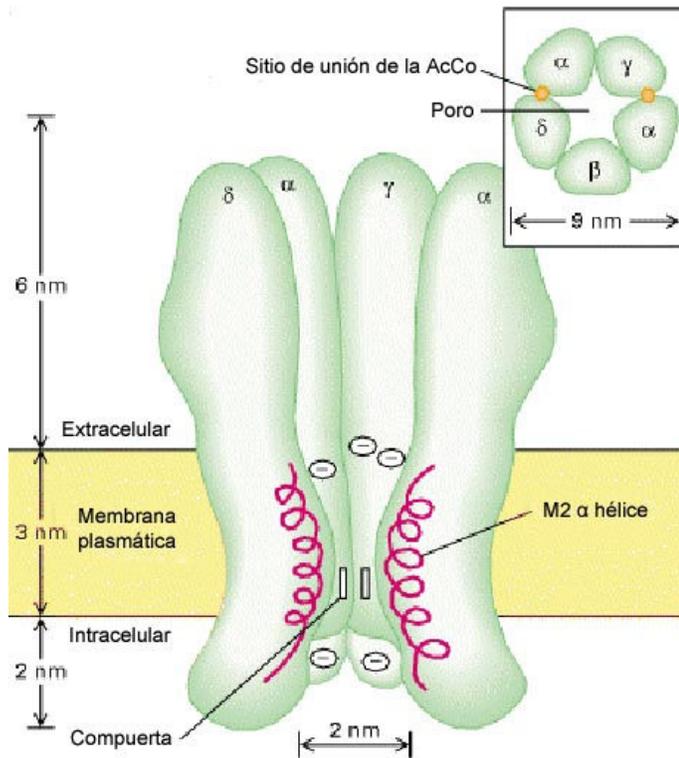


Figura 1. Estructura del R-nic muscular. El R-nic se compone por cinco subunidades insertadas en la membrana plasmática (no se muestra la subunidad β). La estructura α hélice del dominio TM2 de cada subunidad forma la pared del poro. Asimismo se ilustran los anillos con cargas negativas, los cuales después de la unión de la AcCo o alguno de sus agonistas le proporcionan al canal iónico la selectividad al paso de cationes al momento de abrirse la compuerta. En la parte superior derecha se muestran los sitios de unión de las moléculas de AcCo, localizados en las interfases de las subunidades α-δ y α-γ (Modificada de: Lodish et al., 2002).

El dominio extracelular del R-nic contiene las terminales carboxilo y amino de cada subunidad. En la porción amino terminal se ubican los sitios de unión para la AcCo, los cuales están formados por seis aminoácidos de la subunidad α , asimismo contribuyen algunos aminoácidos de las subunidades γ y δ (Brejc et al., 2001).

Las regiones TM2 y TM3 están unidas por una asa extracelular corta. Por su parte, el dominio intracelular del R-nic está formado por una asa corta constituida por aminoácidos entre la región TM1 y TM2 y una asa grande entre TM3 y TM4 (Corringer et al., 2000) (Figura 2).

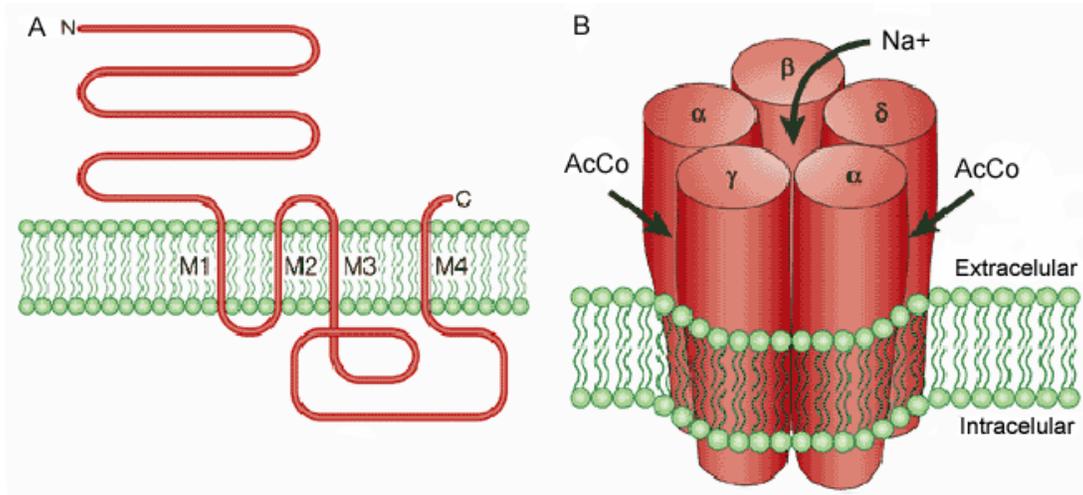


Figura 2. Regiones transmembranales de las subunidades del R-nic. **A.** Cada subunidad atraviesa la membrana plasmática cuatro veces, formando las regiones transmembranales (TM1-TM4). Los grupos amino y carboxilo terminal se ubican en el espacio extracelular. **B.** Las cinco subunidades se unen para formar el R-nic, el cual al ser activado por la AcCo o algún agonista, permite el flujo de cationes como el Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Lodish et al., 2002).

En cada subunidad α existen dos residuos de cisteína en las posiciones 128 y 142, los cuales forman un enlace disulfuro que parece contribuir con el sitio de unión para la AcCo en el receptor. Estos residuos de cisteína se encuentran altamente conservados en la mayoría de los receptores ionotrópicos (Figura 3). Un segundo enlace disulfuro se forma entre las cisteínas 192 y 193, lo cual es utilizado para identificar las subunidades α del R-nic (Siegal et al., 1999). El veneno de víbora, α -bungarotoxina, se une con gran afinidad y especificidad al R-nic en su subunidad α muy

cerca de estos dos residuos de cisteína, propiedad que ha sido utilizada para la purificación de los R-nic (Testai et al., 2000).

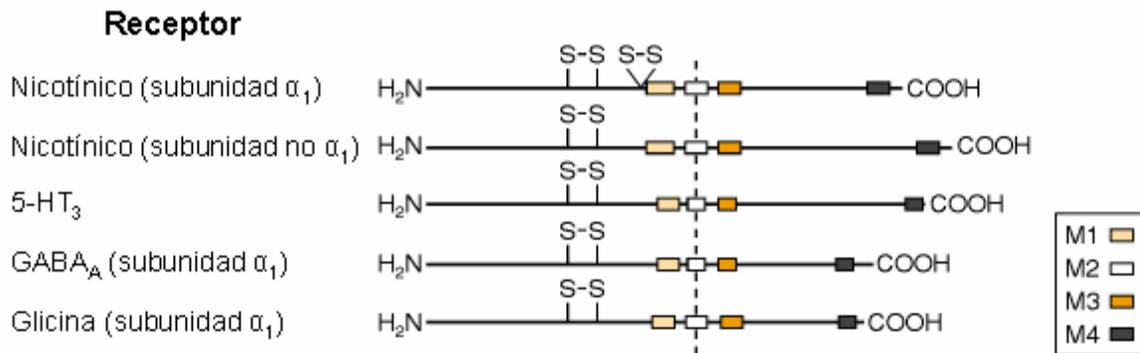


Figura 3. Puentes disulfuro en distintos tipos de receptores ionotrópicos. El asa de cisteínas entre los residuos de cisteínas en las posiciones 128 y 142 de las subunidades α de distintos tipos de receptores, así como los enlaces formados entre los residuos de cisteínas en las posiciones 192 y 193 de la subunidad α del R-nic (Siegal et al., 1999).

Los R-nic neuronales aunque son similares en estructura, difieren de la isoforma del R-nic muscular. Los R-nic neuronales están formados por subunidades α 's (homómeros), o bien por distintos tipos de subunidades α 's y β 's (heterómeros). Hasta la fecha, se han identificado nueve subtipos de la subunidad α en R-nic neuronales (α_2 - α_{10}) y un subtipo α en R-nic musculares (α_1). Algunas de ellas son específicas de especie (α_8 es encontrada solamente en pollo y α_9 en rata). Asimismo existen tres subtipos de la subunidad β en R-nic neuronales (β_2 - β_4) y un subtipo α en R-nic musculares (β_1) (Conroy et al., 1995).

Los R-nic son susceptibles a la acción de distintas sustancias que activan, inhiben o potencian su función. La unión del agonista (la AcCo, el ligando endógeno y la nicotina que actúa como un agonista exógeno) al receptor, induce una serie de cambios conformacionales que causan la apertura del canal, permitiendo un flujo iónico dependiente de su gradiente electroquímico (Waxhman, 1999). En contraste, existen moléculas que al unirse al receptor, inhiben las corrientes inducidas por los agonistas, y se denominan antagonistas de R-nic, tales como la α -bungarotoxina, la metillicaonitina,

el hexametonio, la dihidro- β -eritroidina y la mecamilamina, entre otros (Zhou et al., 2002).

Una vez que se unen dos moléculas de AcCo al R-nic, el canal se abre casi instantáneamente (20 μ s), permitiendo el flujo de iones. Se sugiere que la transición de un canal cerrado a uno abierto está asociada con la rotación de segmentos de la región TM2. Los segmentos TM2 son α -helices y presentan una especie de rosca en su estructura, la cual ejerce una fuerza en un residuo de leucina de cada segmento dentro de un anillo cerrado, el cual efectivamente bloquea el paso de iones a través del poro central del receptor. Cuando el segmento TM2 rota posterior a la unión del agonista, la rosca también rota, relajando la constricción producida por el anillo de leucina, permitiendo con ello el flujo iónico (Bouzat et al., 2000).

Distribución de los R-nic neuronales

Los R-nic neuronales están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso. En el cerebro de la rata adulta la distribución de los subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ es muy extensa, incluyendo cerebro medio, bulbo olfatorio, mesencéfalo, cerebelo, sistema límbico y corteza (Dineley-Miller et al., 1992; Seguela et al., 1993; Alkondon y Albuquerque, 2004) (Figura 4). Además, se ha visto que la expresión de estos subtipos es muy similar en distintos estadios del desarrollo (Tribollet et al., 2004).

Por otra parte, se ha localizado el ácido ribonucleico (ARN) que codifica para las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$ tanto en médula espinal, como en ganglios de la raíz dorsal (Boyd et al. 1991; Khan et al., 2003). Asimismo se ha identificado el ARNm para las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$ en ganglios simpáticos de ratas neonatales (Mandelzys et al., 1994; Zoli et al., 1995) y $\alpha 4$ en ratas adultas (Rust et al. 1994; Klimaschewski et al. 1994).

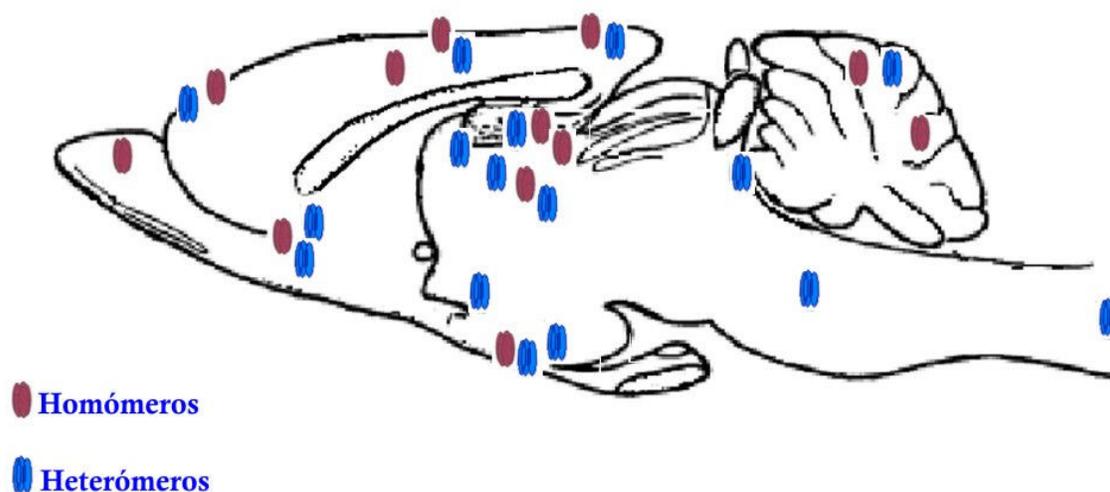


Figura 4. Distribución de R-nic en el cerebro de la rata. Los R-nic se localizan en numerosas estructuras del sistema nervioso. En el esquema se muestra la distribución de los R-nic homoméricos y heteroméricos en el cerebro de la rata (Dineley-Miller et al., 1992; Seguela et al., 1993; Mandelzys et al., 1994; Rust et al., 1994; Khan et al., 2003; Alkondon y Albuquerque, 2004).

Existen numerosos trabajos que estudian la distribución de los R-nic en la rata, sin embargo, poco se sabe de la distribución de los mismos en otros modelos animales. En un trabajo realizado en monos, se encontró que la distribución de los transcritos de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ de los R-nic, están presentes en múltiples áreas del sistema nervioso, que incluyen estructuras de neocorteza, rinencéfalo, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, puente de Varolio y cerebelo. En cambio la distribución de los transcritos de las subunidades $\alpha 6$ y $\alpha 3$ es más restringida en núcleos catecolinérgicos y el cerebelo. En lo particular, las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 4$, se localizan ampliamente en estructuras como corteza del cíngulo, corteza piriforme, giro dentado, regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo y subículum; cabe mencionar que algunas de éstas pertenecen al sistema límbico, el cual se ha asociado fuertemente con el establecimiento del estado emocional (Quik et al., 2000; Milak et al., 2005; Nicolaidis, 2005).

Los R-nic pueden estar localizados a nivel presináptico y postsináptico. En el año 1961 Koelle propuso que la AcCo, además de cumplir con su acción postsináptica,

podía facilitar su propia liberación en las neuronas preganglionares simpáticas (Koelle, 1961). Los receptores que se encuentran en una célula colinérgica son denominados autorreceptores, y se localizan no sólo en el sistema nervioso central (SNC), sino también en motoneuronas colinérgicas del sistema parasimpático y neuronas somáticas (Todorov et al., 1991).

Subsecuentemente, se encontró que los R-nic podían modular la liberación de otros neurotransmisores desde su respectiva terminal nerviosa, y fueron llamados receptores presinápticos (Langer, 1997). Así, se sabe que los R-nic presinápticos juegan un papel muy importante en la liberación de distintos neurotransmisores (Leslie et al., 2002; Rao et al., 2003). En este sentido, se ha encontrado que la estimulación de R-nic presinápticos, modula la liberación de DA en el estriado ventral y dorsal y en la corteza frontal, NE en el cerebelo, 5-HT en hipocampo, neocorteza, estriado y en núcleos del Rafé, GABA en tálamo, y glutamato en neocorteza, estriado y núcleo del tracto solitario (Zoli et al., 2002; Covernton y Lester, 2002; O'Leary et al., 2003; Sher et al., 2004).

Funciones de los R-nic en el sistema nervioso y su relación con algunas patologías

A los R-nic neuronales se les han atribuido distintas funciones en procesos de tipo cognoscitivo como la atención, el aprendizaje y la memoria (Levin y Rezvani, 2002). Asimismo, se piensa que los R-nic participan en el control del dolor, ya que antagonistas de R-nic como la mecamilamina, bloquean mecanismos de analgesia en los que participa la AcCo (De Freitas et al., 2004).

Los R-nic han sido asociados con el desarrollo de la conducta adictiva al cigarro. Se piensa que el mecanismo por el cual se crea adicción a la nicotina es por la activación de vías dopaminérgicas mesolímbicas, mediante la liberación de DA, posterior a la activación de los R-nic presinápticos. Esto se apoya en el hecho de que la mecamilamina disminuye los efectos causados como parte del síndrome de abstinencia, tales como nerviosismo, irritabilidad y ansiedad (Mihailescu y Drucker-Colín, 2000).

Por otra parte, se han vinculado alteraciones en la función de los R-nic con distintas enfermedades que afectan el SNC. Tal es el caso de desórdenes como la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Gilles de la Tourette, así como en desórdenes del estado de ánimo, como la ansiedad y la depresión (Gotti y Clementi, 2004; Newhouse et al., 2004).

En este sentido, existen evidencias de que el tratamiento con nicotina mejora funciones cognoscitivas como la memoria, concentración y atención, en la enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia y el desorden de hiperactividad con déficit de atención (Levin et al., 2002). Además, la nicotina tiene efectos neuroprotectores sobre desórdenes como la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Gilles de la Tourett y en la depresión mayor (Picciotto et al., 2002). Se piensa que la nicotina actúa modificando los niveles de DA, NE y 5-HT en áreas del cerebro que participan en estos procesos (Singer et al., 2004).

La depresión es un desorden en el estado de ánimo que ha sido asociado con un desbalance de neurotransmisores en el SNC. Las hipótesis biológicas de los desórdenes mentales han sido de enorme valor para el establecimiento de una relación entre la psiquiatría y las ciencias biológicas. Así, la meta de muchos de los estudios relacionados con los desórdenes mentales ha sido identificar cuáles de los mecanismos bioquímicos se relacionan con la patología clínica. Los desórdenes del estado de ánimo se han clasificado en distintos grupos, de acuerdo a las características clínicas que presentan los pacientes.

Si bien el objetivo de este proyecto no es estudiar a la depresión como tal, es importante citar algunos de los síntomas que cursan los pacientes deprimidos, con la finalidad de conocer que existen distintas categorías para los desórdenes relacionados con el estado de ánimo. Una parte importante del tratamiento se basa en la administración de fármacos antidepresivos, dentro de los cuales se encuentra la imipramina que es una de las sustancias estudiadas en este proyecto.

DEPRESIÓN

Existen dos grupos que representan las condiciones psiquiátricas más comunes, éstos son: los desórdenes en el estado de ánimo y la ansiedad. Las dos categorías que pertenecen a los desórdenes relacionados con el estado de ánimo son depresión y enfermedades maniaco depresivas. Éstas se refieren a un grupo de enfermedades mentales caracterizadas por perturbaciones en el afecto lo suficientemente severas para alterar la cognición y relaciones interpersonales; además de que pueden ser alterados los patrones de sueño, el apetito y el nivel de energía durante episodios prolongados (Frances et al., 1994).

Para su estudio los desórdenes del estado de ánimo son divididos en:

- Desórdenes depresivos
- Desórdenes bipolares
- Desórdenes basados en la etiología

Los **desórdenes depresivos** se dividen en desorden depresivo mayor, distimia y desórdenes no especificados. El *desorden depresivo mayor* se caracteriza por exhibir un estado de ánimo deprimido o pérdida de interés, acompañado por al menos 4 síntomas (sentimiento de tristeza, soledad, insomnio o hiperinsomnio, disminución en la habilidad para concentrarse, etc). El desorden denominado *distimia* se determina cuando el paciente presenta al menos dos años de un estado depresivo. El *desorden depresivo no especificado* se diagnostica cuando el historial no se asocia con ninguno de los dos desórdenes mencionados.

Los **desórdenes bipolares** como el desorden bipolar I, bipolar II y ciclotimia, incluyen la presencia de episodios maníacos, mixtos o hipomaniacos, usualmente acompañado de por la presencia de episodios depresivos mayores. En cuanto al *tipo I* se distingue por manifestar uno o más episodios maníacos o mixtos, usualmente acompañado por un episodio depresivo mayor, mientras que el *tipo II* es acompañado por al menos un episodio hipomaniaco. La *ciclotimia* se caracteriza por presentar dos años de numerosos periodos con síntomas hipomaniacos, en la cual no hay criterios para un episodio maníaco y numerosos periodos de síntomas depresivos que no tienen criterios para ser clasificado como un episodio depresivo mayor.

Dentro de los **desórdenes basados en la etiología** se encuentra el desorden por condición médica general y el inducido por sustancias. En el *desorden por condición médica general* existe un prominente y persistente disturbio en el estado de ánimo, el cual es producido como una consecuencia fisiológica directa ante una condición médica general. En el *desorden en el estado de ánimo inducido por sustancias*, sucede lo mismo que en el anterior, siendo la causa el abuso de un medicamento o sustancia química.

Estudios epidemiológicos han mostrado que la depresión se encuentra en distintas culturas, lo cual representa una interacción entre procesos biológicos y psicosociales. El riesgo de tener al menos un episodio mayor de depresión es del 10 al 15% en la población general. Existen cerca de 30 000 muertes por suicidio cada año en los Estados Unidos, los cuales están íntimamente relacionados con la presencia de episodios depresivos (Frances et al., 1994). Con base en esto es importante estudiar y conocer no solamente cuáles son los desórdenes a nivel clínico, sino además a un nivel celular y molecular, para lo cual se han propuesto algunas hipótesis.

HIPÓTESIS DE LA DEPRESIÓN

Existen distintas hipótesis acerca de cuáles son las posibles alteraciones en el SNC durante la depresión. La hipótesis relacionada con las catecolaminas (NE y DA) propone que la depresión es causada por una deficiencia funcional de éstas (Freis, 1954; Janowsky et al., 1972). Esta hipótesis se fundamenta en observaciones clínicas de pacientes tratados con reserpina, que fue utilizada por mucho tiempo en la India para el tratamiento de enfermedades mentales. En los años 50's, fue empleada para el tratamiento de la hipertensión y la esquizofrenia. Sin embargo, se observó que su administración, tanto en humanos como en animales, causaba un síndrome parecido a la depresión, el cual se caracterizaba por presentar sedación y retardo motor (Burell et al., 1956; Bernstein et al., 1957). En la actualidad se sabe que la reserpina bloquea la capacidad de captar y almacenar aminas biogénicas a nivel presináptico, principalmente NE (Bourne HR, 1999), motivo por el cual se formó el vínculo entre una disminución de los niveles de NE con la aparición de síntomas de la depresión. Por su parte, la DA ha sido asociada con el desarrollo de la depresión, ya que se ha reportado

que algunos agonistas de los receptores dopaminérgicos como es el pramipexol, tienen efecto antidepresivo (Zarate et al., 2004). Asimismo, pacientes que padecen Parkinson, enfermedad en la cual los niveles de DA son bajos, suelen presentar episodios depresivos (Avila et al., 2003; Brandstadter y Oertel, 2003). Además se ha visto que personas a las cuales se les disminuye de manera aguda los niveles de tirosina, el principal precursor de la DA, desarrollan episodios de depresión (McLean et al., 2004).

Por otra parte, se plantea que durante la depresión los niveles de 5-HT están disminuidos, ya que si se miden los niveles del principal metabolito de la 5-HT (el ácido 5-hidroxi-indolacético) en fluido cerebroespinal, éstos son bajos en gente que cometió suicidio después de haber desarrollado depresión (Barchas et al., 1994, Westrin y Nimeus, 2003). Los efectos celulares y clínicos de los fármacos antidepresivos apoyan esta hipótesis; ya que su efecto celular más importante consiste en bloquear la recaptura de aminas biogénicas en la terminal nerviosa, incrementando así la concentración del neurotransmisor disponible en el espacio sináptico necesario para la transmisión nerviosa. En la actualidad, numerosos antidepresivos, clínicamente efectivos, inhiben la recaptura de NE, DA y 5-HT, restableciendo sus niveles y con ello disminuyendo los síntomas de la depresión.

Además, se ha propuesto a la AcCo como otro de los neurotransmisores que participan en la patogénesis de la depresión. Esta hipótesis (colinérgica) plantea que el aumento en la transmisión mediada por AcCo promueve la depresión (Janowsky et al., 1972; Shytle et al., 2002). Esta suposición se basa en el hecho de que fármacos del grupo de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, tal como la fisostigmina (enzima que degrada a la AcCo), producen síntomas depresivos (Hasey y Hanin, 1991). Esta hipótesis es de particular interés ya que los R-nic son parte de la transmisión colinérgica, los cuales son modulados por una amplia gama de fármacos con efecto antidepresivo.

En un intento por relacionar el sistema monoaminérgico y el colinérgico con los desórdenes en el estado de ánimo, se ha propuesto que un desbalance entre ambos sistemas puede ser crítico en el desarrollo de la depresión (Barchas et al., 1994).

LOS R-nic Y LA DEPRESIÓN

Dado que se ha relacionado el aumento de la transmisión colinérgica con la depresión, se ha considerado que los R-nic tienen un papel muy importante en este desorden. En este contexto se ha propuesto que los antidepresivos, además de bloquear la recaptura de distintos neurotransmisores, tienen como mecanismo de acción paralelo: inhibir a los R-nic. Por ejemplo, tanto antidepresivos tricíclicos, como inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS), tienen un efecto inhibitorio sobre la función de los R-nic (García-Colunga et al., 1997; Fryer y Lukas, 1999; Hennings et al., 1999; López-Valdés y García-Colunga, 2001; López-Valdés et al., 2002). Por otra parte, antagonistas de R-nic tal como la mecamilamina, muestra un efecto reductor de los síntomas de la depresión (Shytle et al., 2002).

Sin embargo, la función de los R-nic no está dada únicamente por la acción de la AcCo o agonistas y antagonistas específicos de R-nic, sino que además son modulados por otros neurotransmisores, como la 5-HT y compuestos exógenos que modifican el sistema serotoninérgico (García-Colunga y Miledi, 1995). Esto resulta interesante ya que implica que el sistema colinérgico y el serotoninérgico están vinculados funcionalmente, y que además podrían estar interactuando durante el desarrollo de patologías como la depresión. Los antidepresivos, cuyo principal mecanismo de acción, al parecer es modificar los niveles de 5-HT, entre otros; a su vez podrían tener efecto antidepresivo al inhibir a los R-nic. En este sentido no es sorprendente encontrar evidencias que indiquen que ambos sistemas de neurotransmisores se encuentran participando de manera conjunta ante ciertas condiciones.

Es importante mencionar que no sólo sustancias antagonistas de R-nic tienen efecto antidepresivo; por su parte, la nicotina tiene el mismo efecto en pacientes deprimidos. Resulta interesante el hecho de que siendo un agonista, se comporta de manera similar a inhibidores de R-nic. Esto hace pensar que comparten algunas propiedades a nivel conductual, celular y molecular.

A continuación se describen algunas propiedades y características de las sustancias estudiadas en este proyecto, tal como la nicotina, la mecamilamina y la imipramina, las cuales modulan distintos subtipos de R-nic y además poseen efectos antidepresivos.

- **Nicotina**

La nicotina es un compuesto orgánico soluble en agua. Es un alcaloide naturalmente presente en las plantas del género *Nicotiana sp.* Su síntesis es llevada a cabo en las hojas y en la raíz y se distribuye a toda la planta, principalmente en las hojas. Además de estar presente en estas plantas, la nicotina se halla en cantidades más pequeñas en otros miembros de la familia del *solanacee*, que incluye el tomate, la patata, la berenjena y el pimiento (Baldessarini, 2000) (Figura 5).

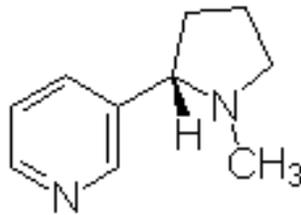


Figura 5. Estructura química de la nicotina. La nicotina es un alcaloide derivado de la ornitina y se encuentra en las plantas del genero *Nicotiana sp.* La fórmula química es C₁₀H₁₄N₂. El nombre químico dado por la IUPAC es 3-(2-(N-metilpirrolidinil)) piridina (Baldessarini, 2000).

Este compuesto químico cruza la barrera hematoencefálica y actúa sobre el SNC como agonista en los distintos subtipos de R-nic neuronales (Picciotto et al., 2000 y 2003). Además, tiene distinta afinidad sobre los distintos tipos de R-nic neuronales. La nicotina tiene más afinidad sobre los R-nic que tienen la subunidad $\beta 2$ en su estructura que aquellos con la $\beta 4$ ($K_{iap} = 4.6 \pm 0.33$ y 26 ± 2.4 nM, respectivamente), donde K_{iap} es la constante de afinidad (Parker et al., 1998). Además, se sabe que el dominio TM1 y TM2 de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$ participan en el grado de afinidad y la potencia de la nicotina en los R-nic (Rush et al., 2002).

Dado que la nicotina es el principal componente del cigarro, ésta tiene importancia médica debido a la tendencia a producir dependencia en fumadores. Se ha visto que la nicotina produce mayor dependencia en personas que presentan desórdenes del estado de ánimo como la depresión, la ansiedad y la esquizofrenia (Glassman et al., 1990; Hawkins, 1997; Olincy et al., 1997; Salin-Pascual et al., 2003). Se piensa que esta dependencia se debe a una aumento en la liberación de DA en el sistema mesolímbico (en especial el núcleo accumbens), efecto que es mediado por los R-nic presinápticos (Dani et al., 2001).

Dado que la nicotina mejora el estado de ánimo en pacientes deprimidos, se piensa que actúa como un antidepresivo. Esto es apoyado por estudios realizados en modelos animales, en donde disminuye el tiempo de inmovilidad (parámetro de depresión), en distintas pruebas conductuales (Ferguson et al., 2000; Popik et al., 2003) así como en humanos en los cuales se administran dosis de nicotina y se observa que los síntomas depresivos disminuyen (Fakhfakh y Lagrue, 2002).

Por otro lado, se ha visto que personas que no tienen un historial depresivo, al momento que dejan de fumar desarrollan cuadros de depresión (Markou et al., 1998; Killen et al., 2003).

- **Mecamilamina**

La mecamilamina es un antagonista de R-nic que fue desarrollada y caracterizada por Merck (Darmstadt, Alemania) como un bloqueador ganglionar con efecto hipotensivo (Stone et al., 1956) (Figura 6).

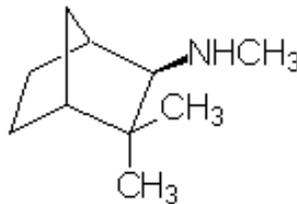


Figura 6. Estructura química de la mecamilamina. La mecamilamina es un compuesto de amonio secundario. Su nombre químico es cloruro de 3-metil amino isocanfano.

La mecamilamina actúa como un antagonista que no compite por el sitio de unión de los agonistas, lo cual indica que se une a un sitio distinto de la nicotina y de la AcCo (Varanda et al., 1985; Giniatullin et al., 2000).

La mecamilamina actúa con distinta potencia en los diferentes subtipos de R-nic. Ésta es más potente inhibiendo R-nic $\alpha3\beta4$ que a los $\alpha4\beta2$, $\alpha3\beta2$ y $\alpha7$ (Papke et al., 2001). Se ha sugerido que el fármaco actúa al unirse de manera selectiva al dominio transmembranal hidrofóbico del receptor, revelando que la mecamilamina no bloquea la unión de la nicotina (Banerjee et al., 1990). Asimismo, se ha visto que el dominio TM2

de la subunidad β es muy importante para que la mecamilamina tenga efecto inhibitorio sobre la función de los R-nic (Webster et al., 1999).

Los efectos de la mecamilamina están muy relacionados con los efectos de la nicotina, dado que la mecamilamina bloquea la mayoría de los efectos fisiológicos y conductuales de la nicotina (Martin et al., 1989). Conjuntamente, existen estudios clínicos en los que se muestra que la mecamilamina disminuye la dependencia a la nicotina (Tennant y Tarver, 1984) y que el tratamiento con parches de nicotina, en conjunto con dosis de mecamilamina, proporciona una mejor terapia para dejar de fumar, disminuyendo los desórdenes en el estado de ánimo (Rose et al., 1994, 1998; Levin et al., 1994).

Por otra parte, se ha reportado que la mecamilamina tiene efectos antidepresivos en humanos (Shytle et al., 2002) y en modelos animales de depresión (Steru et al., 1985; Popik et al., 2003). Estudios como estos indican que la mecamilamina actúa a nivel del SNC, posiblemente actuando sobre R-nic que están en regiones cerebrales que participan en la regulación de las emociones, tal como el sistema límbico. No obstante, aún no está claro el papel que juega como posible agente terapéutico en la depresión, por lo cual sigue siendo objeto de estudio.

- **Antidepresivos**

El tratamiento para la depresión se basa en un grupo de agentes terapéuticos antidepresivos, los cuales se dividen en 3 grupos:

- Antidepresivos tricíclicos.

- Inhibidores de la Monoaminoxidasa (MAO).

- Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS).

Los primeros medicamentos utilizados con este propósito fueron los antidepresivos tricíclicos, los cuales ejercen un efecto modificando el estado de ánimo. Su principal acción es inhibir la recaptura de NE y 5-HT en las terminales nerviosas, lo cual da como resultado la facilitación sostenida de la función noradrenérgica y serotoninérgica en el encéfalo (Humble, 2000). Cabe mencionar que antidepresivos de este grupo, tales como la amitriptilina, imipramina y desipramina tienen efecto inhibitorio

sobre los receptores nicotínicos (López-Valdés y García-Colunga, 2001; Gumilar et al., 2003).

Los mecanismos moleculares de la inhibición de los R-nic por los antidepresivos tricíclicos, han sido estudiados tanto a nivel de canal unitario, como a nivel de corrientes macroscópicas. El principal efecto de los antidepresivos sobre los canales del R-nic, es disminuir la duración de los trenes de apertura de un solo R-nic. Durante un tren de apertura, es posible medir la probabilidad de apertura del canal, y la distribución del estado cerrado y abierto. Con base en esto, se ha visto que la duración de los periodos de activación de los R-nic disminuye de manera dosis dependiente, en presencia de antidepresivos como la amitriptilina, imipramina y doxepina, sin disminuir la amplitud de la corriente. Asimismo, se ha visto que este efecto no depende del voltaje de la membrana celular. Analizando el efecto de la doxepina sobre las corrientes macroscópicas en los R-nic, se observó que ésta aumenta el decaimiento de la corriente por desensibilización de los R-nic, al aplicarse antes o después de la activación de los R-nic con AcCo, sugiriendo que la droga actúa sobre canales en el estado de reposo (cerrado) y en el estado activo (abierto) (Gumilar et al., 2003).

Otro grupo de fármacos antidepresivos son los inhibidores de la MAO, los cuales inhiben la enzima que degrada a las monoaminas en el espacio sináptico, con ello se incrementan las concentraciones cerebrales de estos neurotransmisores (Geneesk, 2003). En 1951 la isoniazida, y su derivado isopropílico la iproniazida, eran utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis; posteriormente, en 1952, Zeller y colaboradores, descubrieron que la iproniazida, tenía efectos antidepresivos inhibiendo la enzima MAO.

Finalmente los ISRS, son fármacos más recientes que han resultado muy eficaces. Su mecanismo de acción es por medio del bloqueo de la recaptura selectiva de 5-HT. De manera interesante, se ha visto que fármacos de este grupo, tal como la fluoxetina, también inhibe las respuestas inducidas por AcCo en R-nic, lo cual indica que podría ser un mecanismo de acción alternativo para esta clase de fármacos (García-Colunga et al., 1997; Hennings et al., 1997 y 1999; Maggi et al., 1998; López-Valdés et al., 2001).

En este proyecto el antidepresivo de estudio es la imipramina, la cual pertenece al grupo de los antidepresivos tricíclicos. Éste es un derivado iminobenzílico, el cual

difiere de las fenotiazinas solo por la sustitución del azufre por un puente etileno. Tiene un anillo central de siete miembros, análogo al de los fármacos antipsicóticos del grupo de la benzazepina (Baldessarini, 2000) (Figura 7).

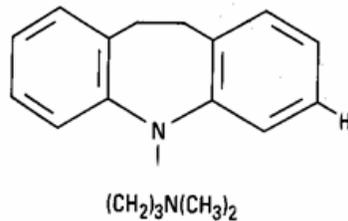


Figura 7. Estructura química de la imipramina. La imipramina es un derivado iminobenzílico utilizado como antidepresivo. Pertenece al grupo de los antidepresivos tricíclicos, llamado así por el núcleo de tres anillos (Baldessarini, 2000).

Durante la investigación clínica de la imipramina, se encontró que, a diferencia de las fenotiazinas era relativamente ineficaz para tranquilizar a los pacientes psicóticos agitados y que sin embargo tenía efectos notables en sujetos deprimidos (Kunh et al., 1958). A partir de esta observación, se han acumulado evidencias que apoyan esta propiedad farmacológica, por lo que en la actualidad es utilizada en la clínica como antidepresivo (Raskin et al., 1970; Beasley et al., 1993). El mecanismo de acción de los antidepresivos tricíclicos es aumentar la función de las aminas biogénicas que al parecer están disminuidas durante la depresión. En particular, la imipramina bloquea la recaptura de NE y de 5-HT así como de DA en un menor grado (Agurell, 1981).

Además de inhibir a los transportadores de NE, 5-HT y DA, se ha visto que inhibe canales de Na^+ , corrientes de K^+ de rectificación tardía así como corrientes de K^+ de tipo transitorio saliente (Nicholson, 2002).

De la misma manera, se ha observado que la imipramina tiene efecto inhibitorio no competitivo sobre las corrientes inducidas por AcCo, en R-nic $\alpha 2\beta 4$ expresados en ovocitos de *Xenopus*. En el mismo estudio se encontró que este efecto es ligeramente dependiente del voltaje, lo cual sugiere que podría actuar en el interior del canal, muy cercano al extremo extracelular de este subtipo de R-nic (López-Valdés y García-Colunga, 2001).

La administración de imipramina, a dosis terapéuticas (75-200 mg/kg) eventualmente produce algunos efectos anticolinérgicos colaterales, tales como aumento de la frecuencia cardiaca, vista borrosa, midriasis, estreñimiento y resequedad en la boca; lo cual apoya los efectos inhibitorios que muestran sobre el sistema colinérgico, en particular sobre los R-nic (Gershon et al., 1980; Mavissakalian et al., 2000; Srinivasan et al., 2004).

Con base en los antecedentes citados, se puede apreciar cómo existe una relación muy importante entre las sustancias a las cuales se les atribuyen efectos antidepresivos, con los R-nic. Tal es el caso de la nicotina, la mecamilamina y la imipramina, las cuales modulan a los R-nic ya sea mediante su activación o su inhibición. Es importante mencionar que, además de los efectos antidepresivos que tienen estas sustancias al administrarse de manera individual, su combinación muestra mayor efecto antidepresivo, aun cuando las dosis son más pequeñas. En un estudio se observó que la combinación de antagonistas de R-nic tales como la mecamilamina y la dihidro β -eritroidina, con antidepresivos como la imipramina y el citalopram, produce un efecto antidepresivo sinérgico en un modelo conductual de depresión (Popik et al., 2003). Asimismo, existen evidencias de un efecto sinérgico al combinar mecamilamina con el antidepresivo amitriptilina (Caldarone et al., 2004). Esto resulta interesante, ya que con base en la hipótesis colinérgica de la depresión, se podría pensar que el mecanismo por el cual se está llevando a cabo este sinergismo, es mediante la inhibición de los R-nic de manera sinérgica.

III. JUSTIFICACIÓN

Los mecanismos fisiopatológicos que anteceden a los desórdenes en el estado de ánimo aún no se conocen en su totalidad. Sin embargo, las evidencias reunidas hasta el momento, permiten inferir que cuando un paciente presenta depresión, el funcionamiento bioquímico del cerebro está desequilibrado. La farmacología, por su parte, ha permitido aclarar parcialmente algunos de los mecanismos por los cuales distintos fármacos antidepresivos tienen efecto. El estudio a nivel celular y molecular de los distintos receptores y transportadores que posiblemente participan en estos desórdenes, en conjunto con la evaluación conductual ante tales sustancias, es importante para tratar de elucidar el mecanismo de acción de diversos fármacos con efecto antidepresivo.

Dado que la imipramina produce efectos secundarios, se han tratado de establecer nuevas estrategias terapéuticas, en la cuales se administren bajas dosis de este fármaco. En estudios realizados en modelos conductuales, se ha visto que al administrar bajas concentraciones de imipramina o amitriptilina, las cuales por sí solas no tienen efecto antidepresivo, al combinarse con nicotina o antagonistas de R-nic como la mecamilamina, se presenta un efecto antidepresivo de manera sinérgica (Popik et al., 2003; Caldarone et al., 2004). Sin embargo, el mecanismo por el que esto puede llevarse a cabo aún no ha sido elucidado y resulta interesante estudiar si el efecto sinérgico observado, podría ser el resultado de la inhibición sinérgica de los R-nic por ambas sustancias. Es por ello que surgió el interés en explorar cuál es el comportamiento de las respuestas eléctricas activadas por nicotina en R-nic $\alpha 4\beta 4$, ante la combinación de estas sustancias, por lo que planteamos lo siguiente.

IV. HIPÓTESIS

Los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, pueden ser modulados sinérgicamente por la combinación de imipramina y mecamilamina.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el efecto de la mecamilamina en receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$, se modifica por la imipramina, y viceversa. Asimismo, determinar los mecanismos de acción y los sitios de unión de estas sustancias en los R-nic.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Expresar R-nic neuronales heterólogos $\alpha 4\beta 4$ en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- ❖ Estudiar las corrientes eléctricas inducidas por nicotina en presencia de mecamilamina e imipramina en R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$, mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos.
- Determinar la EC_{50} de nicotina en R-nic $\alpha 4\beta 4$.
- Determinar la IC_{50} de la mecamilamina y la imipramina.
- Estudiar competitividad de ambas sustancias por el sitio de unión de la nicotina.
- Evaluar dependencia al voltaje y el posible sitio de unión (aplicando rampas de voltaje que van de -140 a +40 mV en 2 s).
- Comparar la potencia de la mecamilamina con la de imipramina para inhibir las corrientes inducidas por nicotina sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$.
- Valorar el efecto sinérgico comparando los efectos de la mecamilamina y la imipramina aplicadas de forma individual, con los efectos de ambas sustancias aplicadas en combinación.
- Estudiar competitividad entre estas dos sustancias y evaluar dependencia del voltaje de membrana.

Nota:

La EC_{50} es la concentración de fármaco a la cual se produce el 50 % del efecto. La IC_{50} es la concentración a la cual se bloquea el 50 % de la respuesta inducida por el agonista.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el proyecto se utilizó un modelo de expresión heteróloga de receptores, el cual se obtiene mediante la expresión exógena de receptores en la membrana del ovocito de la rana *Xenopus laevis*. Este sistema tiene la ventaja de ser una célula que posee pocas conductancias iónicas endógenas, en la cual se puede expresar el receptor de interés y evaluar su comportamiento eléctrico en presencia de distintos fármacos.

En este trabajo se realizó la expresión de R-nic $\alpha 4\beta 4$ mediante la inyección de la mezcla de los ARN's que codifican para las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 4$ del R-nic de rata. Para ello se siguió con distintas metodologías descritas a continuación.

OBTENCIÓN DE ARN CODIFICANTE PARA CADA SUBUNIDAD DEL R-nic

Para llegar a la obtención del ARN que codifique para cada subunidad del R-nic, se requiere de técnicas adicionales de biología molecular. Dentro de ellas se encuentran:

- Bacterias TB1 calcio competentes.
- Transformación de bacterias con plásmido y cultivo
- Siembra de colonias en medio LB líquido para realizar MAXIPREPS (Qiagen).
- Obtención de ADN plasmídico mediante MAXIPREPS (Purificación de ADN).
- Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro.
- Linearización de ADN con enzimas de restricción.
- Purificación de ADN linearizado por el método de extracción fenol-cloroformo.
- Transcripción *in vitro*.
- Purificación de ARN por el método de extracción fenol-cloroformo.
- Cuantificación de ARN en el espectrofotómetro.

Bacterias TB1 calcio competentes

Materiales

1. Bacterias TB1
2. Medio LB (Luria Bertani) sin ampicilina.
3. Cloruro de calcio (CaCl_2).
4. Glicerol.

Procedimiento

Se cultivan las bacterias TB1 en medio LB a 37°C en agitación constante durante 24 hs. Posteriormente, se coloca una alícuota de 1 ml de cultivo bacteriano en 200 ml de medio LB y se mide la absorbancia de la mezcla en el espectrofotómetro a 400 nM (ésta es útil como punto de referencia para la obtención posterior de cultivos de densidad bacteriana óptima). Así, se cultiva la mezcla a 37°C en un agitador automático durante 2 hs con 30 min. La mezcla es vertida en tubos Falcon para centrifugarse a 7000 rpm durante 5 min. Se agregan 10 ml de CaCl_2 a la pastilla, a una temperatura de 4°C y se resuspende la solución utilizando un Vortex. Esta solución se incuba durante 30 min. A continuación se centrifuga a 7000 rpm durante 5 min, Se desecha el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 2 ml de CaCl_2 a 4°C. Finalmente, las alícuotas que se vayan a utilizar a continuación se almacena a 4°C y las que no se guardan en glicerol a -80°C (15ml de bacterias por 5 ml de glicerol).

Transformación de bacterias con plásmido y cultivo

Materiales

1. Alícuotas de bacterias TB1 calcio competentes.
2. Plásmidos con el ácido desoxirribonucleico (ADN) de interés incorporado.
3. Medio LB sin ampicilina.
4. Baño de agua a 42°C.
5. Agitador de bacterias a 37°C.
6. Cajas de Petri preparadas con medio de cultivo LB con ampicilina
7. Hielo.

Procedimiento

Se descongela una alícuota de bacterias competentes en hielo y se añaden 5 ng del ADN de interés (plásmido con el ADNc de interés incorporado), se dan ligeros golpes para agitar la solución y se incuba en hielo durante 30 min. Ésta se coloca en un baño de agua a 42°C durante 50 s y se pasa a hielo por 2 min (este cambio de temperatura permitirá que el ADN ingrese a la célula). Se añaden 200 µl de medio LB sin ampicilina y se agita durante 45 min a 37°C. Una vez terminado el periodo se toman 50 µl y se colocan sobre una caja Petri con medio LB con ampicilina y se espatula la solución (cerca del mechero). Se deja secar el líquido por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se incuba a 37°C durante 16 hs con el agar hacia arriba. Al día siguiente deberán crecer colonias blancas de un solo tipo (resistentes a ampicilina y con el ADN de interés incorporado).

Siembra de colonias en medio LB líquido para realizar MAXIPREPS

Materiales

1. Bacterias transformadas.
2. Medio LB líquido con ampicilina.

Procedimiento

Se toma una colonia de bacterias transformadas (aislada) con un asa bacteriológica y se siembra en 200 ml de medio LB líquido con ampicilina en un matraz Erlenmeyer. Se mantiene en agitación constante a 200 rpm a una temperatura de 37°C durante 16 hs. Al término de este tiempo, se coloca en hielo para detener el crecimiento.

Obtención de ADN plasmídico mediante MAXIPREPS (Purificación de ADN)

De la muestra que se dejó en hielo, se purifica el ADN por medio del estuche de MAXIPREPS (Qiagen, Plasmid Maxi Kit).

Materiales

1. Isopropanol.
2. Agua estéril.
3. Soluciones proporcionadas en el estuche.

Amortiguador	Composición
Amortiguador P1 (amortiguador para resuspender).	50 Mm Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnasa A.
Amortiguador P2 (amortiguador de lisis).	200 mM NaOH, 1 % SDS (p/v).
Amortiguador P3 (amortiguador de neutralización).	4 M acetato de potasio, pH 5.5.
Amortiguador QBT (amortiguador de equilibrio).	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15 % isopropanol (v/v); 0.15 % Tritón X-100 (v/v).
Amortiguador QC (amortiguador de lavado).	1 m NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15 % isopropanol (v/v).
Amortiguador QF (amortiguador de elución).	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15 % isopropanol (v/v).

Procedimiento

El cultivo de bacterias se centrifuga a 6 000 rpm durante 20 min a 4°C. Al término de la centrifugación se decanta el sobrenadante y se resuspende la pastilla resultante de los 200 ml de cultivo, en 10 ml de amortiguador P1 al que previamente se le añadió la ARNasa. Posteriormente se lisan las células agregando 10 ml del amortiguador P2 y se mezcla invirtiendo el tubo 8 veces. Se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 min, se adicionan 10 ml de amortiguador P3 y se mezcla invirtiendo el tubo 8 veces. La mezcla se deja reposar en hielo durante 20 min. Al término de este tiempo se centrifuga a 6 000 rpm durante 30 min a 4°C.

Aproximadamente 10 min antes de que termine de centrifugarse la muestra, se prepara una columna de separación aplicando 10 ml de amortiguador QBT y se espera a que pase todo el líquido.

El líquido resultante de la centrifugación se filtra a través de una gasa limpia y se deposita en otro tubo. Este líquido limpio se coloca en la columna previamente

preparada y se espera a que pase totalmente por la columna. Al terminar se aplican 30 ml del amortiguador QC y posteriormente se vuelven a aplicar 30 ml del mismo para lavar por segunda vez. Así, se cambia la columna a un tubo de recolección limpio (estéril) y se añaden 15 ml de amortiguador QF para eluir la muestra. A este líquido se le añaden 15 ml de isopropanol, se mezcla y se guarda a -30°C por 20 min (en este punto la muestra puede permanecer almacenada por tiempo indefinido).

Posteriormente se centrifuga la muestra a 10 000 rpm durante 30 min a 4°C. Se decanta el sobrenadante y a la pastilla se añaden 5 ml de etanol al 70%. Se centrifuga a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C, se decanta el sobrenadante y se invierte el tubo durante 15 min para eliminar exceso de líquido. La pastilla se disuelve en 300 µl de agua estéril y se cuantifica en el espectrofotómetro.

Finalmente, se pasa esta solución de ADN total a un tubo eppendorf y se etiqueta (nombre de la muestra, concentración, fecha) para almacenarse a -20°C por tiempo indefinido.

Nota: la muestra obtenida es ADN circular y hay que linearizarlo.

Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro

Materiales

1. Agua estéril.
2. Muestra de ADN.
3. Espectrofotómetro.

Procedimiento

Se enciende el espectrofotómetro previamente y se espera a que se calibre. Se elige la opción correspondiente a lectura de ácidos nucleicos (ADN). Se añaden 400 µl de agua estéril en la celdilla blanco, se coloca en el carril correspondiente y se toma la lectura. Posteriormente se mide la absorbancia de la muestra a 260 nm, para la cual se toma 1 µl de la muestra de ADN y se resuspende en 399 µl de agua estéril. La fórmula para obtener la concentración de ADN es:

$$[\text{Valor de absorbancia} \times 50 \times \text{dilución (400)}] / 1000$$

Ejemplo: la lectura a 260 nm es 0.106 y la dilución es de 400 veces.

$$0.106 \times 50 \times 400 = 2120 / 1000 = 2.12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Linearización de ADN con enzimas de restricción

Materiales

1. Enzimas de restricción específicas para cada subunidad:
 - α 4: Eco R1 (amortiguador 3).
 - β 4: XhoI (amortiguador 2).
2. Agua estéril.
3. Agarosa.

Procedimiento

Con base en la concentración del ADN extraído por el método de Qiagen, se toman 50 μ g de ADN, los cuales serán linearizados con 0.2 μ l de enzima por cada μ g de ADN (2 unidades de enzima por cada μ g de ADN = 10 μ l). Se añade el volumen del amortiguador que corresponda a la enzima (1X) y se ajusta a un volumen total de 60 μ l con agua estéril. Se mezcla, se centrifuga brevemente para bajar la mezcla y se incuba a 37°C durante 1 h y 30 min.

Para asegurarse de que la muestra se haya linearizado, se hace un gel con 0.5 μ g del ADN; de no se así se añade más enzima y se incuba por 1 hora más.

Nota: el orden en que se agregan los reactivos al tubo de reacción es el siguiente: ADN, agua, amortiguador y finalmente la enzima (mantener en hielo hasta antes de añadirse la última).

Ejemplo para linearizar la muestra de ADN con enzimas de restricción.

Fórmula $v = m/c$

Donde: v = volumen m = masa = 50 μ g c = concentración de

ADN total para la subunidad β 4 = 1.42 μ g/ μ l $v = 50 \mu\text{g} / 1.42 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 35.21 \mu\text{l}$

ADN 35.21 μ l

Xho I 10 μ l (0.2 X 50 = 10 μ l)

Amortiguador 6 μ l (1 μ l por cada 10 μ l del volumen total)

Agua 8.79 μ l (aforar a un volumen final de 60 μ l)

Total: 60 μ l

Purificación de ADN linearizado por el método de extracción fenol-cloroformo

Materiales

1. Agua DEPC 0.1%
2. Amortiguador TE pH 8.0 en agua DEPC 0.1%.
3. Solución SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1).
4. Acetato de sodio 3M pH 6.0.
5. Etanol al 100%.
6. Etanol al 70%.

Procedimiento

La mezcla de reacción del ADN linearizado se lleva a un volumen de 100 μ l con agua DEPC al 0.1%. Se mezcla, se añaden 50 μ l de fenol saturado (con amortiguador TE pH 8.0) y 50 μ l de solución SEVAG y se agita suavemente 20 s. Se centrifuga por 3 min a 10 000 rpm a temperatura ambiente. Se recupera la fase superior (muestra) con cuidado para evitar que se mezcle con el fenol y se coloca en otro tubo. Se agregan 100 μ l SEVAG y se agita suavemente 20 s. Se vuelve a centrifugar por 3 min a 10 000 rpm a temperatura ambiente (se puede reperir este paso para eliminar contaminación por fenol).

Una vez obtenida la fase superior limpia, se añade acetato de sodio 3 M pH 6.0 y etanol 100% enfriado el hielo (0.5 y 2.5 del volumen total, respectivamente). Se mezcla en vortex durante 1 min y se incuba a -70°C durante 20 min.

Al término de este tiempo, se centrifuga a 10 000 rpm a 4°C por 20 min, se decanta con cuidado y a la pastilla se le añade 1 ml de etanol al 70%. Se vuelve a centrifugar a 10 000 rpm por 20 min a 4°C, se decanta el sobrenadante y se deja evaporar el exceso de etanol. La pastilla se resuspende en 50 μ l en agua desionizada estéril (DEPC 0.1%) para que resulte una concentración final de aproximadamente 1 μ g/ μ l. Finalmente se lee en el espectrofotómetro, siguiendo los pasos de la lectura del ADN total y se guarda a -20°C por tiempo indefinido.

Transcripción *in vitro*

Por medio de este método se obtiene el ARN a partir del ADN linearizado, el cual finalmente será inyectado en los ovocitos.

Materiales

La mezcla de reacción es la siguiente:

Reactivo	Cantidad
Amortiguador de transcripción	10 μ l
DTT 100 mM	5 μ l
Mezcla de nucleótidos*	5 μ l
“Capping” 5 mM	5 μ l
ADN linearizado	10 μ g
Rnasin	1.25 μ l
Polimerasa (SP6 o T3)**	40 unidades
Agua libre de RNasas	Hasta alcanzar 50 μ l

* La mezcla de nucleótidos se prepara previamente añadiendo:

2 μ l de ATP, 2 μ l de TTP, 2 μ l de CTP y 1.5 μ l de GTP.

** Polimerasa

SP6 (500U) 2.7 μ l

T3 (1000 U) 1.35 μ l

Procedimiento

En primer lugar se llevan los reactivos a temperatura ambiente (amortiguador de transcripción, DTT, mezcla de nucleótidos y el “capping”). Una vez alcanzada la temperatura ambiente se adicionan según el orden en la lista. Las enzimas (RNasin y polimerasa) se transportan en hielo justo antes de ser añadidas. Una vez adicionados todos los reactivos, se mezclan y se centrifugan por 20 segundos. La mezcla se incuba a 37°C durante 2 hs. Al término de este tiempo se añade la misma cantidad de polimerasa y se incuba por 2 hrs más. Finalmente se adiciona 1 unidad de DNasa por cada μ g de ADN linearizado y se incuba durante 15 min. El transcrito se purifica por el método de extracción fenol-cloroformo.

Purificación de ARN por el método de extracción fenol-cloroformo

Materiales

1. Agua DEPC 0.1%
2. Amortiguador TE pH 4.5 en agua DEPC 0.1%.
3. Solución SEVAG (colorformo: alcohol isoamílico, 24:1).
4. Acetato de amonio 7.5M.
5. Etanol al 100%.
6. Etanol al 70%.

Procedimiento

La mezcla de reacción del ARN se lleva a un volumen de 100 μ l con agua DEPC al 0.1%. Se mezcla, se añaden 50 μ l de fenol saturado (con amortiguador TE pH 8.0) y 50 μ l de solución SEVAG y se agita suavemente 20 s. Se centrifuga por 3 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente. Se recupera la fase superior (muestra) con cuidado para evitar que se mezcle con el fenol y se coloca en otro tubo. Se agregan 100 μ l SEVAG y se agita suavemente 20 s. Se vuelve a centrifugar durante 3 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente (se puede reperir este paso para eliminar contaminación por fenol).

Una vez obtenida la fase superior limpia, se añade acetato de amonio 7.5 M y etanol al 100% enfriado en hielo (0.5 y 2.5 del volumen total, respectivamente). Se mezcla en vortex durante 1 min y se incuba a -70°C durante 20 min.

Al término de este tiempo, se centrifuga a 12 000 rpm a 4°C por 20 min, se decanta con cuidado y a la pastilla se le añade 1 ml de etanol al 70%. Se vuelve a centrifugar a 12 000 rpm por 20 min a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se deja evaporar el exceso de etanol. La pastilla se resuspende en 5 μ l en agua desionizada estéril (DEPC 0.1%) a temperatura ambiente. Finalmente se cuantifica el ARN en el espectrofotómetro y se guarda a -70°C por tiempo indefinido.

Cuantificación de ARN en el espectrofotómetro

Materiales

1. Agua estéril.
2. Muestra de ARN.

3. Espectrofotómetro.

Procedimiento

Se enciende el espectrofotómetro previamente y se espera a que se calibre. Se elige la opción correspondiente a lectura de ácidos nucleicos (ARN) y se lee a una absorbancia de 260 nm. Se añaden 400 µl de agua estéril en la celdilla blanco, se coloca en el carril correspondiente y se toma la lectura. Posteriormente se mide la absorbancia de la muestra, para la cual se toma 1 µl de la muestra de ARN y se resuspende en 399 µl de agua estéril. La fórmula para obtener la concentración de ARN es: [Valor de absorbancia x 40 x dilución (400)] / 1000

EXTRACCIÓN DE OVOCITOS DE *Xenopus laevis*

Ovocitos de *Xenopus laevis* como modelo para el estudio de receptores

Los ovocitos de *Xenopus laevis*, son un modelo experimental introducido por el Dr. Ricardo Miledi como una herramienta para la expresión heteróloga de receptores de membrana y que en la actualidad es muy utilizada por numerosos laboratorios de investigación. Para ello, los ovocitos son inyectados con ARN que codifique para la proteína de interés que será expresada utilizando la maquinaria interna de los mismos. De esta manera, se pueden estudiar las propiedades de las corrientes inducidas a través del canal del receptor por los agonistas, con un alto nivel de sensibilidad y selectividad.

Una vez que los receptores se expresan en la membrana del ovocito, se estudian las corrientes eléctricas, mediante una técnica que se fundamenta en la fijación de voltaje.

Preparación de los ovocitos de *Xenopus laevis* para microinyección

El ovario de rana tiene de 24 a 28 lóbulos o sacos con folículos de ovocitos en varios estadios de desarrollo, éstos miden aproximadamente 1.5 mm de diámetro. Los ovocitos son obtenidos de ranas maduras de la especie *Xenopus laevis*, adquiridas en Nasco (Fort Atkinson, WI. USA) y son mantenidas en condiciones de bioterio (Figura 8). Previo a la disección la rana es anestesiada cubriéndola con hielo durante 30 min. Con la ayuda de una navaja de bisturí, se realiza una incisión de aproximadamente un

centímetro de longitud en la capa externa e interna del extremo inferior ventral de la rana, a partir de ésta se extraen los lóbulos ováricos, los cuales desde este momento son mantenidos a 16 °C en una caja de Petri con solución de Barth (mM): 88 NaCl, 1 KCl, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 2.4 NaHCO₃, 5 HEPES (pH 7.4) y 0.1 mg/ml de sulfato de gentamicina.



Figura 8. Rana *Xenopus laevis* adulta. Anfibio casi exclusivamente acuático que habita naturalmente en el sur de África. Pertenece al Orden *Anura* y al Suborden *Pipoidea*. Existen grandes poblaciones en California, Chile, Gran Bretaña y probablemente otras regiones del mundo.

Una vez que son extraídos los lóbulos ováricos rodeados de tejido conectivo, se sutura el epitelio que protege el peritoneo con dos puntos, y posteriormente la piel. Finalmente la rana se mantiene en un recipiente con agua limpia, y se traslada al bioterio en donde se recupera de la cirugía. Los ovocitos en el estadio V y VI de desarrollo, son disgregados manualmente con pinzas de disección bajo el microscopio estereoscópico, hasta obtener células individuales (Figura 9).



Figura 9. Disección de la rana, obtención de lóbulos y separación de ovocitos. En **A** se muestra a la rana durante la cirugía en el momento donde los lóbulos son extraídos con una pinza de disección. Posteriormente los lóbulos (**B**) son separados en células individuales (**C**) para así ser inyectados con la mezcla de ARNm.

Inyección de ovocitos de *Xenopus*

Al día siguiente los ovocitos son inyectados con 50 nl de la mezcla de cada uno de los ARN's que codifican para las distintas subunidades del R-nic, a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con un nanoinyector (Nanoliter 2000, World Precision Instruments, Inc. Modelo B203XVY). Después de ser inyectados son mantenidos a 16 °C en solución Barth's. Con el objeto de remover las células foliculares y los receptores nativos embebidos en la membrana de los ovocitos, después de dos días son tratados por 10-15 minutos con colagenasa tipo 1 a una concentración 0.5 mg/ml en Ringer normal (mM): 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES a un pH de 7.0.

La solución de Barth en la que se mantiene a los ovocitos, es continuamente renovada y además se separan los ovocitos que hayan muerto para evitar daño a los viables.

REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

Fundamentos de la técnica de fijación de voltaje

Esta técnica fue desarrollada por Kenneth Cole en 1949 con el objeto de controlar el potencial de membrana de neuronas con propósitos experimentales. La fijación de voltaje con dos microelectrodos, es una de las técnicas que permite al experimentador fijar el potencial de membrana a valores predeterminados.

Debido a que los canales activados por voltaje se cierran o abren continuamente en respuesta a cambios en el potencial de membrana, la fijación de voltaje previene los cambios resultantes en las corrientes de membrana provocados por cambios en el potencial. Es por ello que esta técnica permite realizar mediciones del efecto producido por los cambios en el potencial sobre la conductancia a especies iónicas.

Un electrodo es el encargado de medir el voltaje de membrana, mientras que el otro inyecta corriente dentro de la célula para mantener el voltaje constante. Estos electrodos están conectados a un circuito de retroalimentación que compara las mediciones de voltaje a través de la membrana con el voltaje que determinó el experimentador. Si estos dos valores difieren, se inyecta corriente por el otro electrodo para compensar la diferencia. Este ciclo continuo de retroalimentación, en el que el voltaje es medido y la corriente es inyectada, fija efectivamente el voltaje de membrana a un valor específico. La corriente inyectada por el electrodo es equivalente a la corriente que fluye a través del canal iónico, por lo que esta corriente es la medida por el experimentador. Además, las corrientes iónicas son dependientes del voltaje y tiempo, comienzan a ser activas a ciertos potenciales de membrana y con una velocidad particular; al mantener el voltaje constante, permite que estas dos variables sean separadas; la dependencia de voltaje y la cinética de las corrientes iónicas a través de la membrana pueden ser medidas directamente (McCormick, 1999).

Registro electrofisiológico de ovocitos inyectados

Las corrientes de membrana se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos después de 4-9 días de la inyección de ARNm, tiempo en el cual se lleva a cabo la traducción de los transcritos y la incorporación de los receptores a la membrana del ovocito.

Una vez que el ovocito expresa a los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ en su membrana, éste es colocado en una cámara de registro, la cual es perfundida continuamente con solución Ringer. La aplicación de las distintas soluciones se realizó mediante un sistema de perfusión a una velocidad de 10 ml/min. El líquido fue removido de la cámara a través de una pipeta conectada a un sistema de vacío.

Todas las soluciones fueron preparadas con Ringer, y los receptores fueron activados con nicotina y en algunos experimentos con AcCo. Las respuestas fueron registradas con ayuda de un amplificador comercial (Warner OC-725A; Warner Instruments Corp, Hamden, CT, USA) y detectadas con un osciloscopio (Nicolet 310; Nicolet instruments Corp, Madison, WI, USA). El voltaje de membrana al que fue fijado el ovocito fue -60 mV (a reserva de que sea especificado en un experimento particular). Los registros fueron almacenados para análisis posterior con los programas Nicolet y Origin (versión 4.1).

VII. RESULTADOS

Una vez que los ovocitos expresaron R-nic $\alpha 4\beta 4$, se estudiaron las corrientes inducidas por nicotina y su modulación por mecamilamina e imipramina a distintas concentraciones. Para ello se utilizó la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos, en la cual se fijó el voltaje de la membrana del ovocito a -60 mV. Cabe mencionar que el voltaje de membrana en reposo de los ovocitos fue de -20.5 ± 7.6 mV ($n= 67$).

Se realizaron distintas estrategias de aplicación de cada una de las sustancias estudiadas. En la mayoría de los experimentos se trabajó con $1 \mu\text{M}$ de nicotina, concentración a la cual la desensibilización de los R-nic es muy baja, con lo que se puede evaluar de manera clara el efecto de los inhibidores de la corriente.

Los primeros objetivos del proyecto fueron estudiar, los efectos de la mecamilamina y la imipramina aplicados de manera individual sobre las corrientes inducidas por nicotina. Esto fue con la finalidad de tener un punto de comparación al momento de evaluar el efecto al ser combinadas. Asimismo, se realizó la relación concentración de nicotina vs efecto, para obtener la EC_{50} .

Por otra parte, se evaluaron las respuestas inducidas por la mecamilamina y la imipramina en función del voltaje de membrana del ovocito. Para ello se aplicaron rampas de voltaje de 2 s, que van desde los -140 a los $+40$ mV. Uno de los aspectos que se puede evaluar con este protocolo, es si los antagonistas se unen dentro o fuera del canal iónico del R-nic.

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante la realización del proyecto, los cuales llevaron a un análisis e integración de información importante, para el conocimiento de las propiedades de cada una de las sustancias estudiadas, sus mecanismos de acción y su posible implicación en el tratamiento de la depresión.

Corriente iónica en función de la concentración de nicotina

En esta serie de experimentos se registraron las corrientes iónicas activadas por distintas concentraciones de nicotina, esto con la finalidad de obtener la EC_{50} de nicotina en R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$.

De acuerdo con la técnica de fijación de voltaje, para que la membrana del ovocito sea mantenida a un voltaje establecido (-60 mV), se requiere de la inyección de corriente por uno de los electrodos; esta corriente se denomina corriente de mantenimiento y se observa como una línea continua en el plano horizontal hasta antes de la aplicación del agonista (Figura 10a, flecha). Una vez que la nicotina es perfundida e interactúa con los R-nic, éstos se activan permitiendo el paso de iones a través del canal, lo cual justo es una corriente eléctrica. Esta corriente se observa como un desplazamiento hacia abajo, y es denominada por convención como una corriente entrante (Figura 10b). Esta respuesta llega a su valor máximo y después va disminuyendo lentamente dependiendo de la concentración de nicotina, producto de la desensibilización de los R-nic.

Las concentraciones de nicotina probadas fueron desde 1 μM a 4 mM. Según la relación concentración vs efecto, la nicotina tiene un efecto máximo a 100 μM , después de esa concentración la magnitud de la respuesta es de menor amplitud. Las corrientes fueron normalizadas a la corriente máxima (Figura 10).

En el inserto de la Figura 10 se ilustran los registros que corresponden a tres de los puntos de la curva concentración vs efecto de nicotina; en ellos se observa cómo la amplitud de la corriente es menor para una concentración 5 μM que para 50 μM . Sin embargo, para una concentración 1 mM de nicotina, la corriente es menor. Es decir, la amplitud de la corriente aumenta conforme se va aumentando la concentración de nicotina hasta un punto máximo a partir del cual la amplitud de la corriente es menor.

El efecto de la concentración sobre la desensibilización de los R-nic es muy evidente, ya que a bajas concentraciones (5 μM) la desensibilización es muy pequeña, es decir, en presencia del agonista la corriente se mantiene casi constante durante el curso del tiempo; mientras que al aumentar la concentración de nicotina (50 μM) la desensibilización es mayor, lo cual se puede observar en el decaimiento de la corriente. Finalmente, cuando se aplican concentraciones como 1 mM, la desensibilización es aun mayor; en el registro se observa una corriente entrante muy rápida que disminuye cerca de la corriente basal aun en presencia de nicotina.

La concentración de nicotina aplicada a lo largo de este proyecto fue de 1 μM , la cual según la relación concentración vs efecto, produce aproximadamente el 6% del

efecto máximo. Cabe mencionar que dado que las concentraciones altas de nicotina desensibilizan fuertemente a los R-nic, dificulta evaluar su efecto neto sobre la corriente. Es por ello que no se puede realizar un ajuste de los datos con la ecuación de Hill. Por lo tanto, no se puede calcular la EC_{50} de esta manera, por lo que se reportará únicamente como la concentración que produce el 50% del efecto máximo observado, la cual fue de $50.0 \pm 13.7 \mu\text{M}$ ($n = 8$).

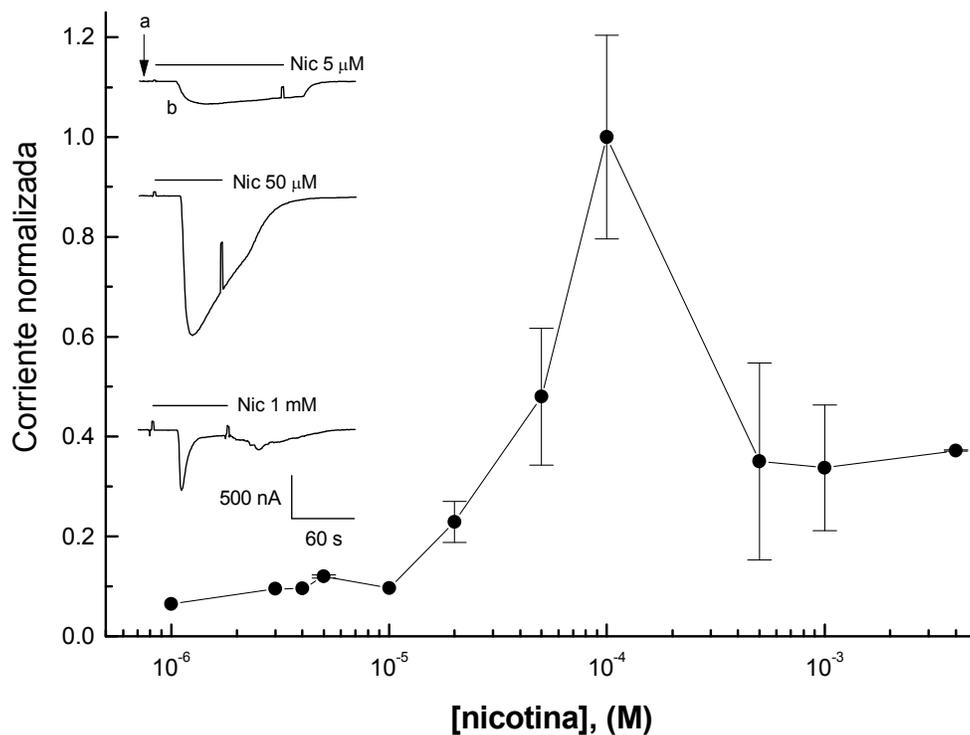


Figura 10. Relación concentración de nicotina vs efecto. Inserto: se muestran los registros electrofisiológicos a distintas concentraciones de nicotina (Nic). En (a) se indica el curso de la corriente de mantenimiento, la cual se modifica como una corriente entrante (b) en presencia del agonista. En los registros se puede observar el cambio de la corriente iónica. El decaimiento de la corriente, reflejo de la desensibilización, es más rápido a concentraciones más altas de nicotina. El eje de las ordenadas corresponde a la corriente normalizada a la corriente máxima, obtenida con una concentración $100 \mu\text{M}$ y el de las abscisas a la concentración molar (M) de nicotina ($n = 8$).

Con la finalidad de comparar cuál es la potencia de AcCo y nicotina sobre las corrientes generadas en los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$, en la Figura 11 se muestra el efecto, producto de la activación de los R-nic $\alpha 4\beta 4$ en presencia de AcCo 1 μM (primera inflexión) y de nicotina 1 μM (segunda inflexión). La corriente inducida por AcCo fue de 320 nA mientras que la respuesta obtenida con nicotina fue de 1293 nA. Es decir, la corriente inducida por nicotina es aproximadamente cuatro veces mayor a la inducida por AcCo. Esta diferencia en la magnitud de las respuestas, indica que la nicotina es más potente activando a los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$ que la misma AcCo (Figura 11).

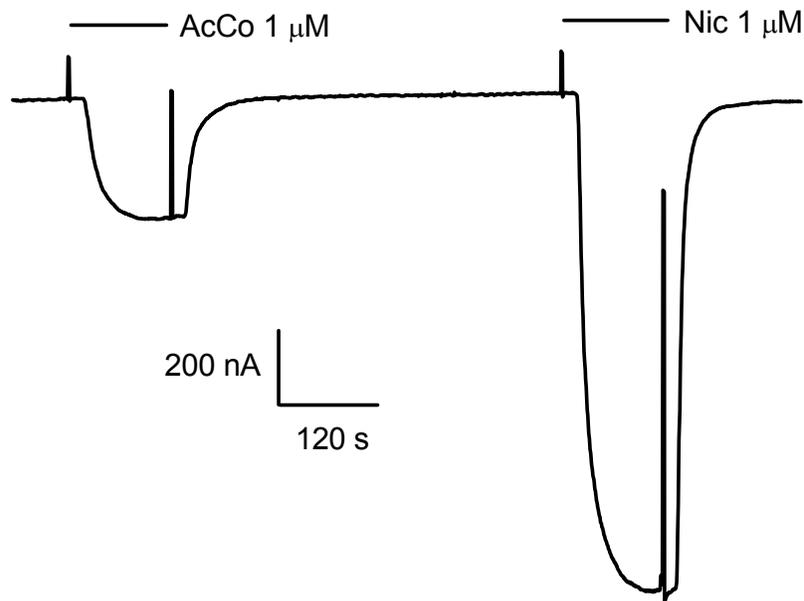


Figura 11. Corrientes iónicas inducidas por AcCo y por nicotina. Registro electrofisiológico continuo en el cual se observa una mayor respuesta al aplicar 1 μM de nicotina (Nic), en comparación con 1 μM de AcCo. Las líneas continuas indican el tiempo de aplicación de las sustancias. El registro fue realizado en el mismo ovocito.

Efecto de la mecamilamina en las corrientes activadas por nicotina

A continuación se evaluó el efecto que tiene la mecamilamina sobre la corriente inducida por nicotina en R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$. Para ello se obtuvo el registro control que muestra el comportamiento de la corriente iónica durante 6 min de perfusión continua de nicotina 1 μM (Figura 12, trazo a). Posteriormente se activaron a los R-nic

con nicotina a la misma concentración, y después de dos minutos se perfundió la mecamilamina (Figura 12, trazo b), este registro fue sobrepuesto con el registro control con la finalidad de comparar ambos comportamientos y observar el cambio neto que es inducido por la mecamilamina. La magnitud de la corriente control en este registro fue 261 nA, la cual se redujo a 160 nA después de 2 min en presencia de mecamilamina 10 nM. El porcentaje de inhibición promedio para esta concentración fue de $41.2 \pm 1.53 \%$, $n = 5$.

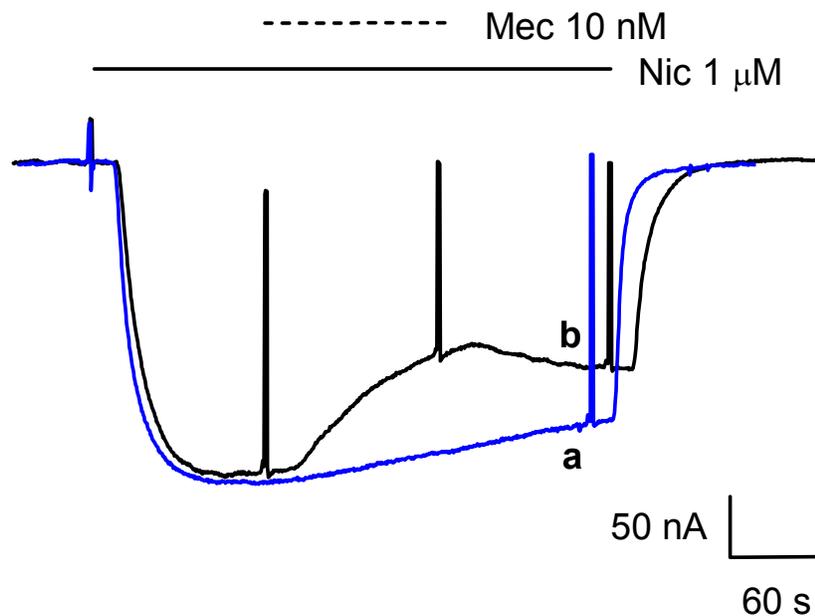


Figura 12. Efecto inhibitorio de la mecamilamina. Los R-nic $\alpha 4\beta 4$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, fueron activados con nicotina (Nic). En (a) se muestra la corriente inducida por una aplicación larga de nicotina 1 μ M. En (b) se observa la disminución de la corriente activada con nicotina por una concentración baja de mecamilamina (Mec). La línea continua indica el tiempo de aplicación de nicotina, mientras que la línea punteada indica el tiempo de aplicación de mecamilamina 10 nM ($n = 5$).

Relación concentración de mecamilamina vs efecto

Una vez que se evaluó el efecto de la mecamilamina sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$, se probaron distintas concentraciones con el objeto de encontrar la concentración de mecamilamina que inhibe el 50% de la respuesta máxima (IC_{50}). Para ello se realizó el

registro electrofisiológico de las corrientes inducidas por nicotina 1 μM , en presencia de distintas concentraciones de mecamilamina; las cuales van desde aquellas que no tienen efecto hasta aquellas que inhiben totalmente la corriente (1 nM a 1 μM).

Los resultados mostraron que conforme va aumentando la concentración de mecamilamina, su efecto inhibitorio sobre la corriente control (inducida por nicotina) va siendo mayor. Dicho efecto se analiza como la razón de la corriente en presencia de mecamilamina y la corriente control (I_e/I_c), ambas medidas al mismo tiempo, cuatro minutos después de iniciada la aplicación de nicotina. El valor de este parámetro nos indica lo siguiente: en caso de no mostrar ningún efecto sobre la corriente control, la razón será igual a la unidad. Si tiene un efecto inhibitorio su magnitud será menor a la unidad y en el caso de ser un potenciador, la razón será mayor a la unidad. En el inserto de la Figura 13 se observan los registros que corresponden a tres de las concentraciones estudiadas. En el primer trazo se muestra el efecto inhibitorio de la mecamilamina 10 nM, la cual inhibe en promedio el $41.2 \pm 1.53 \%$. En el segundo se observa el efecto inhibitorio de la mecamilamina 50 nM, el cual es aproximadamente $69.6 \pm 2.1 \%$. Finalmente con mecamilamina 500 nM el bloqueo de la corriente es de $98.5 \pm 1.5 \%$.

Los datos obtenidos en cada registro fueron analizados con estadística descriptiva, obteniendo las medias y el error estándar para cada valor, los cuales fueron graficados y ajustados con la ecuación de Hill:

$$I_{[\text{mecamilamina}]} = I_0 * IC_{50} / ([\text{mecamilamina}]^{nH} + IC_{50}^{nH}),$$

donde: $I_{[\text{mecamilamina}]}$ es la amplitud de la corriente inhibida por la mecamilamina, I_0 es la magnitud de la corriente control, IC_{50} es la concentración de mecamilamina que inhibe el 50% de la corriente control y nH es el coeficiente de Hill. A partir de esta ecuación se calculó el valor de la IC_{50} de mecamilamina en R-nic $\alpha 4\beta 4$ activados por nicotina 1 μM , obteniendo un valor de 12.2 ± 2.1 nM, con un coeficiente de Hill de 1.14 ± 0.07 . El coeficiente de Hill indica el número de moléculas de mecamilamina necesarias para inhibir las corrientes iónicas a través de los R-nic, el cual es aproximadamente la unidad.

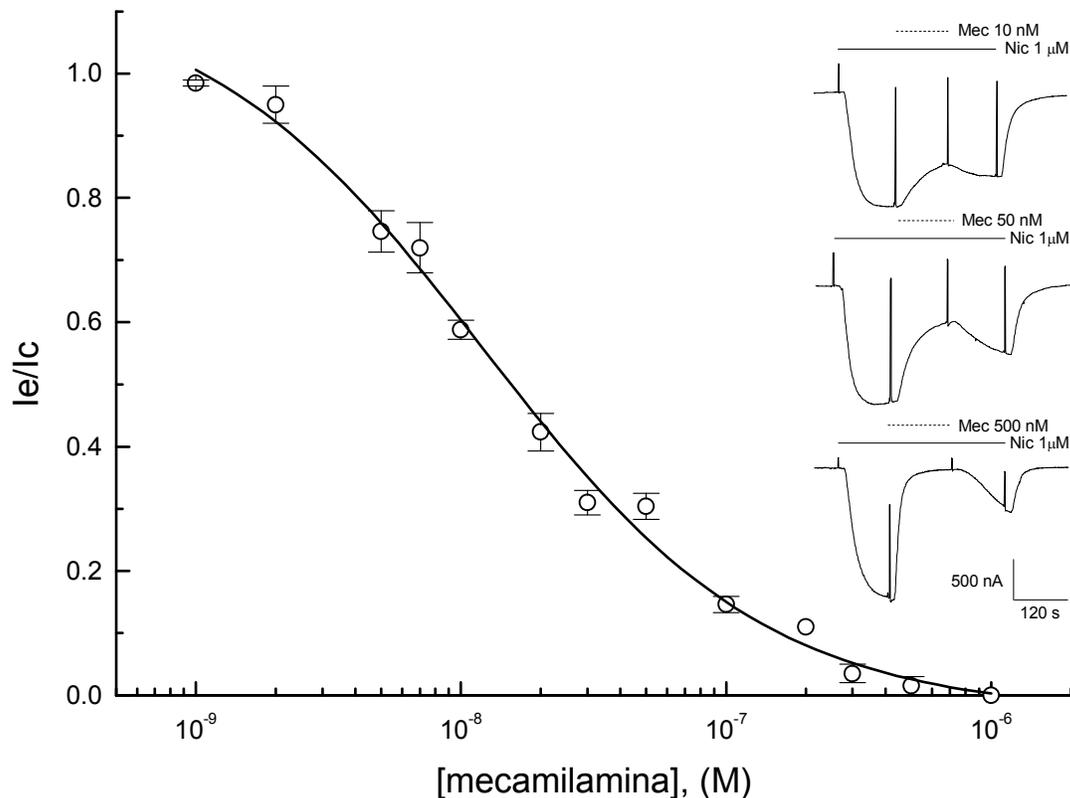


Figura 13. Bloqueo de la respuesta por mecamilamina en función de su concentración. Relación concentración vs efecto de mecamilamina (Mec) en corrientes activadas con 1 μ M de nicotina (Nic). En el eje de las ordenadas se grafica la razón obtenida de la corriente en presencia de mecamilamina y la corriente control (I_e/I_c). En el eje de las abscisas se grafica la concentración de mecamilamina (M), en escala logarítmica. Inserto: registros obtenidos con distintas concentraciones de mecamilamina inhiben la corriente inducida por nicotina ($n = 6$).

Recuperación de la inhibición de mecamilamina

En los registros presentados en la relación concentración de mecamilamina vs efecto, el comportamiento de la corriente iónica después de la aplicación de mecamilamina es diferente dependiendo de su concentración. Es decir, la recuperación de la inhibición por mecamilamina es más rápida a concentraciones menores. Sin embargo, el tiempo de lavado fue de solamente 2 min, en el que no se logra apreciar

claramente cuál es el curso de la recuperación de la corriente inducida por la nicotina, y además no se alcanzó un estado estable.

Con el objeto de estudiar cuál es la magnitud de la corriente que se obtiene después de que la mecamilamina es retirada de la perfusión, se realizó otra serie de experimentos con tiempos de lavado de 8 min. Asimismo, con la finalidad de evaluar la influencia de la concentración sobre el comportamiento de la corriente en la recuperación, se probaron dos concentraciones de mecamilamina (50 y 500 nM). El tiempo de lavado se refiere al tiempo de recuperación de la corriente después de que se retiró a la mecamilamina de la perfusión, dejando únicamente a la nicotina. Para poder comparar el efecto que tiene la mecamilamina sobre la corriente en presencia de nicotina, se perfundió continuamente nicotina 1 μ M durante 12 min (corriente control), tiempo que incluye los 2 min de la aplicación del agonista, 2 min del antagonista y los 8 min de lavado.

La corriente control inducida por nicotina alcanza su efecto máximo aproximadamente a los 20 s, posteriormente como resultado de la desensibilización de los R-nic ante la continua presencia del agonista, la corriente va disminuyendo gradualmente hasta que a los 12 min la corriente que permanece con respecto al punto máximo es sólo el 50 ± 5 %. Comparando el valor de la corriente control a los 12 min de perfusión de nicotina, con el valor de la corriente experimental con 50 nM de mecamilamina, se observó que la fracción de la corriente que permanece con respecto al valor máximo fue del 49%. En el caso de 500 nM de mecamilamina, la corriente que permanece es del 55 ± 2 %.

De acuerdo con estos resultados, la mecamilamina a ambas concentraciones (50 y 500 nM) se lava casi totalmente a los 8 min. El tiempo en el cual se eliminó el efecto inhibitorio fue de 4.5 min en el caso de la mecamilamina a 50 nM, y a los 6 min a una concentración de 500 nM (Figura 14).

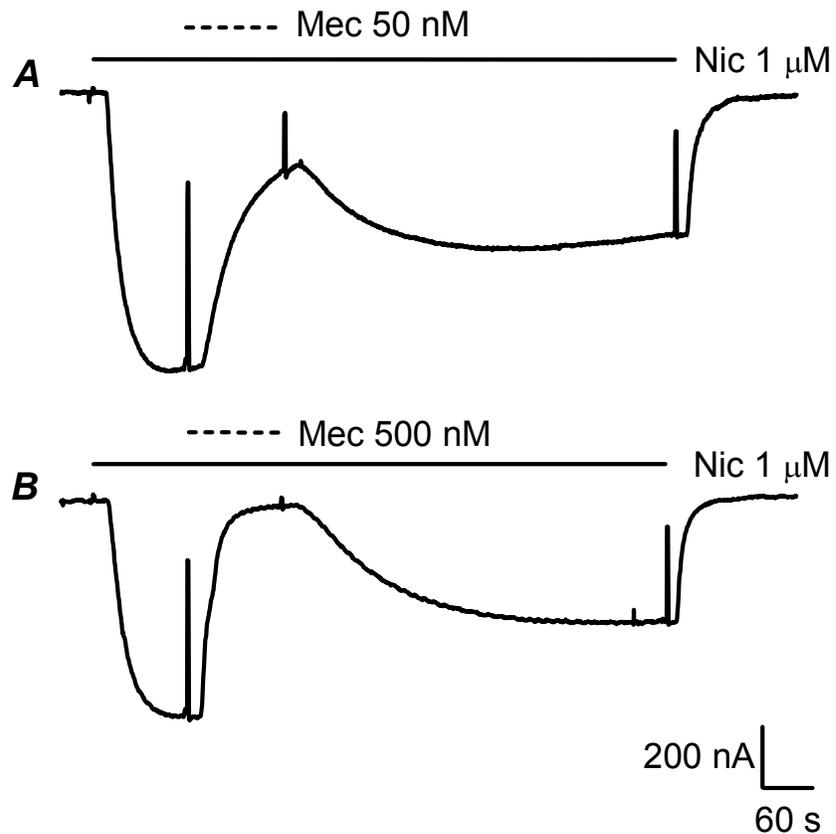


Figura 14. Tiempo de recuperación de la corriente inhibida por mecamilamina. Registros que muestran el comportamiento de la corriente iónica después de retirar a la mecamilamina (Mec) de la perfusión con una concentración de 50 nM (**A**) y 500 nM (**B**). La magnitud de la corriente que permanece después de lavar por 8 min es muy similar a la corriente control en ambas concentraciones. Los registros fueron obtenidos del mismo ovocito ($n = 2$).

Mecamilamina como antagonista no-competitivo

Se sabe que la mecamilamina actúa como antagonista nicotínico no-competitivo en distintos subtipos de R-nic (Varanda et al., 1985; Giniatullin et al., 2000). En este proyecto se evaluó si este fármaco compite o no con la nicotina, por el mismo sitio de unión en los R-nic $\alpha 4\beta 4$. Para ello se evaluó el efecto de una concentración de mecamilamina (100 nM) con tres concentraciones de nicotina (1, 5 y 20 μM).

Los resultados mostraron que la amplitud de la corriente va aumentando en función de la concentración de nicotina, así como la rapidez de desensibilización. Además, 100 nM de mecamilamina inhibe aproximadamente el mismo porcentaje de la corriente iónica inducida por las tres concentraciones de nicotina, ya que inhibió el 84.67 ± 2.02 % para 1 μM ; 91.5 ± 0.5 % para 5 μM y 93.67 ± 1.86 % para 20 μM . Esto indica que la mecamilamina actúa como un antagonista no-competitivo. En la Figura 15 se ilustran los tres registros que pertenecen a las concentraciones de nicotina evaluadas.

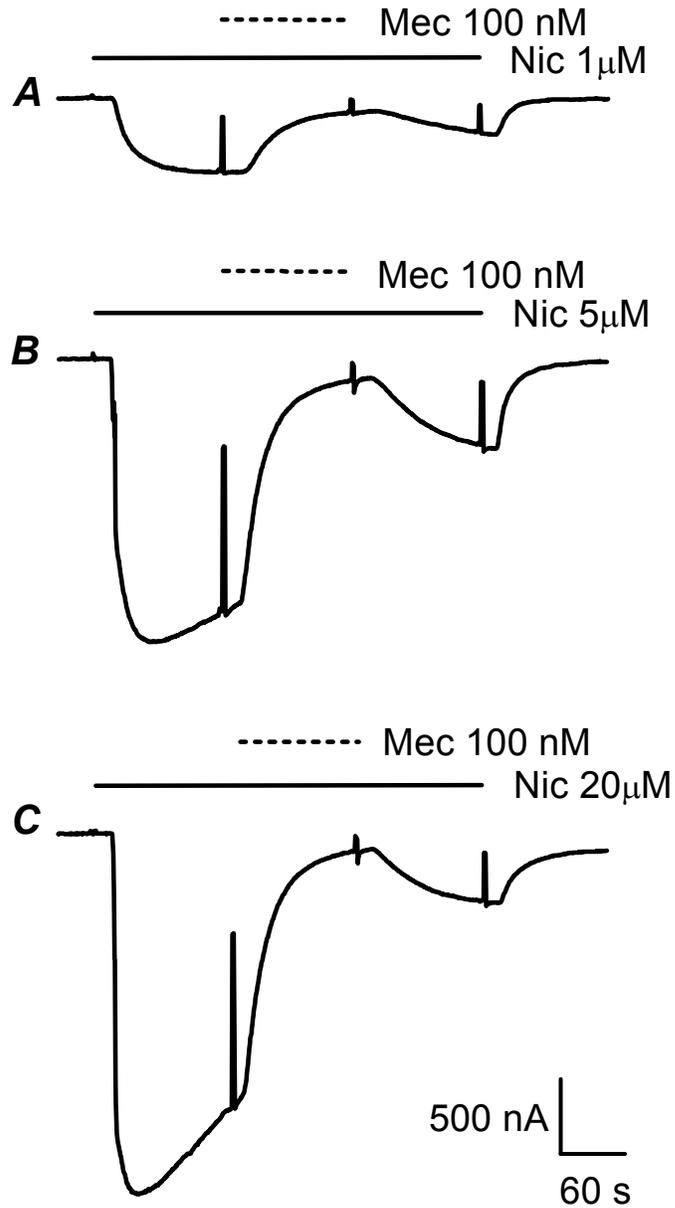


Figura 15. Mecamilamina como antagonista no-competitivo de los R-nic. Efecto inhibitorio de 100 nM de mecamilamina (Mec) sobre la corriente iónica inducida con 1 μM (**A**), 5 μM (**B**) y 20 μM (**C**) de nicotina (Nic). Los efectos inhibitorios son aproximadamente de la misma magnitud, independientemente de la concentración de agonista utilizada. Esto indica que la mecamilamina es un antagonista no-competitivo. Los registros fueron del mismo ovocito ($n = 3$).

Una vez que se cumplió con una parte importante de los objetivos, la cual consistía en estudiar algunas propiedades de la mecamilamina, se procedió a evaluar el efecto y propiedades de la imipramina, para finalmente evaluar su combinación con la mecamilamina.

Efecto de la imipramina en corrientes activadas por nicotina

En este trabajo se probó el efecto de la imipramina sobre las corrientes activadas con nicotina en R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$. Con la finalidad de determinar la modificación de la corriente iónica en presencia de imipramina y calcular la magnitud del bloqueo, se realizó el mismo procedimiento que el utilizado para la mecamilamina. Es decir, se activaron corrientes con nicotina a una concentración 1 μM y después de dos minutos se perfundió la imipramina; asimismo se obtuvo el registro control que muestra el comportamiento de la corriente durante 6 min de perfusión continua de nicotina y se comparó con el anterior.

Los resultados mostraron que la imipramina tiene un efecto inhibitorio sobre las corrientes iónicas inducidas por nicotina. En la Figura 16 se observa que la magnitud de la corriente control fue de 214 nA, la cual se redujo a 40 nA al aplicar imipramina 5 μM . Esto se traduce en 81.3 % de inhibición sobre la corriente control.

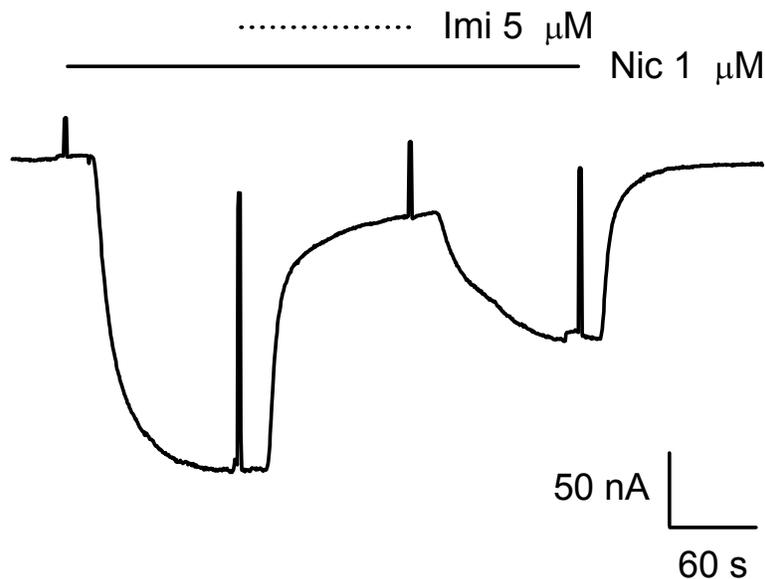


Figura 16. Efecto inhibitorio de la imipramina. Los R-nic $\alpha 4\beta 4$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* fueron activados con nicotina (Nic). El bloqueo de la corriente se obtuvo con 5 μM de imipramina. La línea continua indica el tiempo de aplicación de nicotina, mientras que la línea punteada indica el tiempo de aplicación de imipramina ($n = 6$).

Relación concentración de imipramina vs efecto

En esta parte del proyecto lo que se hizo fue evaluar el efecto de distintas concentraciones de imipramina, con la finalidad de construir la relación concentración vs efecto y encontrar la IC_{50} . Las concentraciones probadas van desde aquellas que no tienen efecto inhibitorio hasta aquellas que inhibieron casi totalmente la corriente iónica inducida por nicotina. El intervalo de concentraciones fue entre 10 nM y 30 μM .

Conforme va aumentando la concentración de imipramina, el bloqueo de la corriente va siendo cada vez mayor. La respuesta es analizada como la razón de la corriente en presencia de imipramina y la corriente control (I_e/I_c), ambas medidas al mismo tiempo, cuatro minutos después de iniciada la aplicación de nicotina 1 μM . Cabe mencionar que el valor del parámetro I_e/I_c fue siempre menor a la unidad, indicando un efecto inhibitorio en todos los casos.

En la Figura 17 se muestra el efecto de imipramina en función de la concentración y los registros representativos a algunas concentraciones (inserto). En el caso de la concentración 0.3 μM de imipramina, se obtuvo una inhibición promedio de $32.29 \pm 2.35 \%$, para 1 μM de $53.33 \pm 2.91 \%$ y para 10 μM de $94 \pm 3 \%$. Los datos obtenidos fueron analizados con estadística descriptiva, obteniendo las medias y el error estándar para cada valor, los cuales fueron graficados y ajustados con la ecuación de Hill:

$$I_{[\text{imipramina}]} = I_0 * IC_{50} / ([\text{imipramina}]^{nH} + IC_{50}^{nH}).$$

A partir de esta ecuación se calculó el valor de la IC_{50} de imipramina en R-nic $\alpha 4\beta 4$ activados por nicotina 1 μM , obteniendo un IC_{50} de $1.16 \pm 0.26 \mu\text{M}$, y un coeficiente de Hill de 1.06 ± 0.05 .

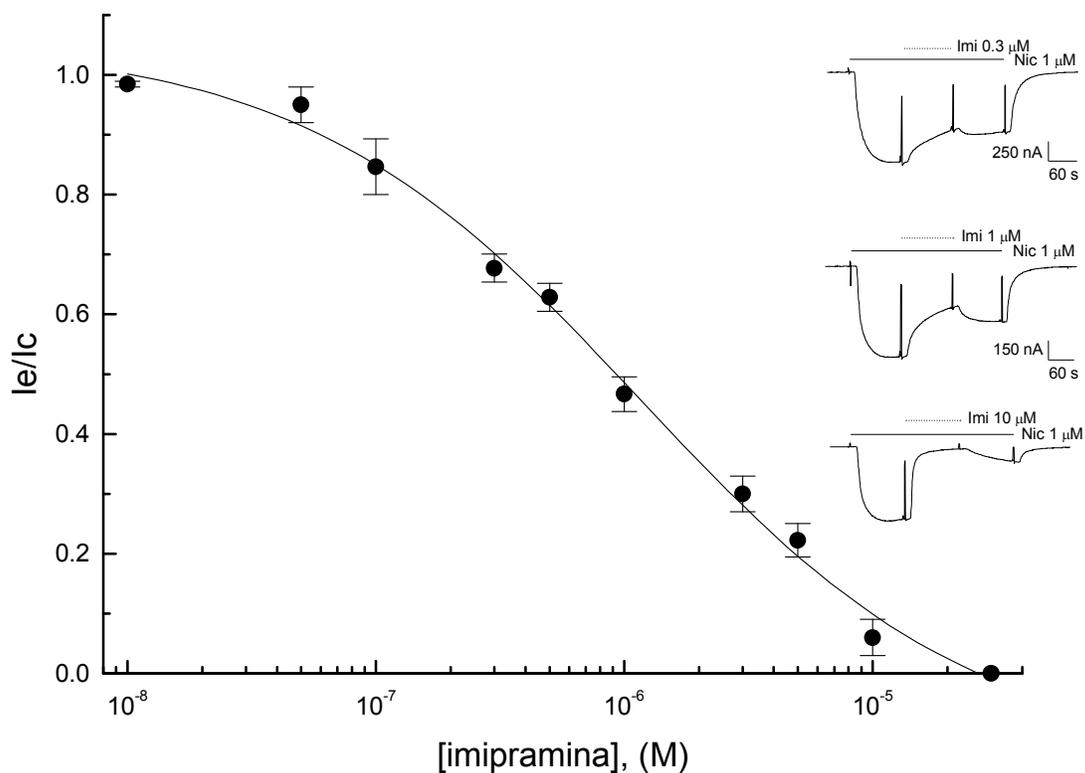


Figura 17. Bloqueo de la respuesta por imipramina en función de su concentración. Relación concentración de imipramina (Imi) vs efecto, en corrientes inducidas con 1 μM de

nicotina (Nic). En el eje de las ordenadas se grafica (I_e/I_c) y en el eje de las abscisas la concentración molar (M) de imipramina, en escala logarítmica. Conforme aumenta la concentración de este fármaco, la fracción de la corriente que permanece es menor. Inserto: registros que muestran cómo distintas concentraciones de imipramina inhiben la corriente inducida por nicotina (n = 7).

Además se probó si el efecto de la imipramina cambiaba en función de la concentración de nicotina y con ello evaluar si se trata de un antagonista que compite por el sitio de unión de la nicotina o no. Para ello se realizaron los siguientes experimentos.

Imipramina como antagonista no-competitivo

De la misma manera que se evaluó el efecto de la mecamilamina sobre las corrientes iónicas inducidas por tres concentraciones de nicotina (1, 5 y 20 μM), se determinó si la imipramina actúa de manera competitiva o no-competitiva en R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$. Los resultados mostraron que la imipramina actúa como un antagonista no-competitivo, ya que al aumentar la concentración de nicotina, no hay una disminución en la inhibición dada por una concentración constante de imipramina (5 μM). La inhibición de la corriente fue 81 ± 0.88 % para 1 μM , 84 % para 5 μM y de 93 ± 1.53 % para 20 μM de nicotina. En la Figura 18 se ilustran los registros representativos de dos de las concentraciones evaluadas.

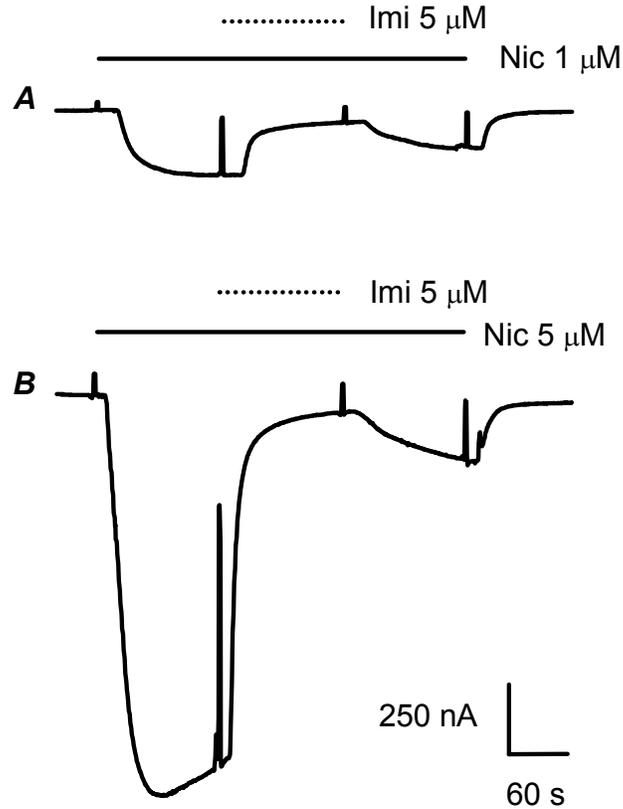


Figura 18. Imipramina como antagonista no-competitivo de los R-nic. El efecto inhibitorio de la imipramina (Imi) sobre la corriente iónica inducida con 1 μM (**A**) y 20 μM (**B**) de nicotina (Nic). Contrario a lo que sucede en el caso de antagonistas competitivos, el efecto inhibitorio no se ve disminuido al aumentar la concentración de nicotina ($n = 3$).

Esto indica que al igual que la mecamilamina, la imipramina tiene un sitio de unión distinto al que tiene la nicotina, de tal manera que no se compite por el sitio de unión aun a altas concentraciones de nicotina.

Después de que se evaluaron algunas características de los efectos que tiene la imipramina y la mecamilamina, lo que se hizo fue comparar las relaciones concentración vs efecto de ambas, con la finalidad de mostrar cuál de las dos sustancias es más potente inhibiendo a los R-nic del subtipo $\alpha 4\beta 4$.

Comparación de la potencia inhibitoria entre mecamilamina e imipramina

Para determinar qué tan potente es una sustancia con respecto a otra, se tiene que conocer la EC_{50} ó la IC_{50} : concentración de fármaco que se requiere para producir o inhibir el 50% del efecto máximo. En este caso, dado que se trata de inhibidores, se comparan las IC_{50} de la mecamilamina y de la imipramina. En la Figura 19 se ilustra la gráfica que contiene a las dos curvas de inhibición en función de la concentración de mecamilamina e imipramina (Figuras 13 y 17), en la cual se observa que la curva de imipramina se encuentra desplazada hacia la derecha con respecto a la de mecamilamina. Esto indica que la potencia farmacológica de la imipramina es de menor magnitud que la de mecamilamina, ya que se requiere una mayor concentración de imipramina ($1.16 \mu\text{M}$) para inhibir el 50% de la corriente iónica, con respecto a la mecamilamina (12.2 nM).

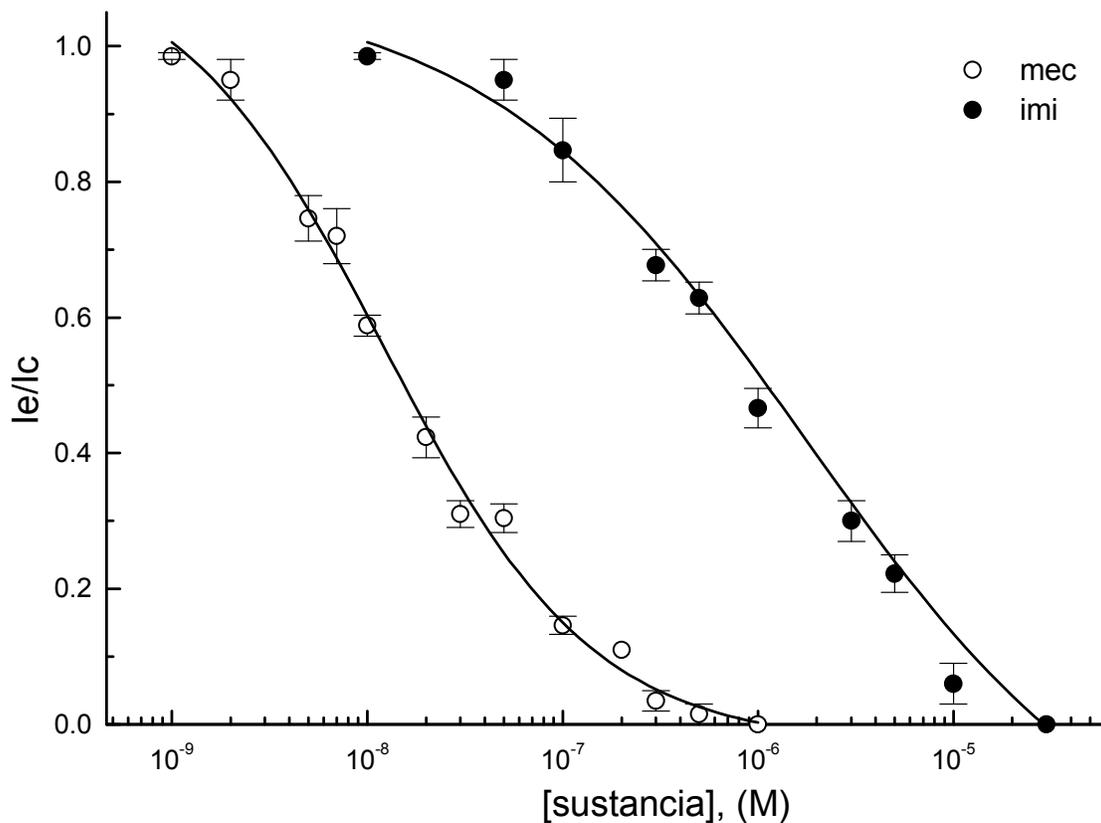


Figura 19. Comparación de las relaciones de concentración vs efecto para mecamilamina e imipramina. La relación para imipramina (Imi) está desplazada a la derecha con respecto a la relación de mecamilamina (Mec). Las corrientes fueron inducidas con 1 μ M de nicotina. En el eje de las ordenadas se grafica (I_e/I_c) y en el eje de las abscisas la concentración molar (M) de la sustancia, en escala logarítmica. Los datos fueron obtenidos de seis y siete ovocitos para Mec e Imi, respectivamente.

Una vez que la mecamilamina e imipramina fueron estudiadas de manera individual, se evaluó el efecto de la combinación de ambas sustancias. Para ello se siguieron distintas estrategias de aplicación que se describen a continuación.

Efecto de la combinación de mecamilamina e imipramina sobre las corrientes activadas por nicotina

El objetivo principal del presente trabajo, fue determinar si el efecto de la mecamilamina (antagonista de R-nic), se modifica por la presencia de imipramina (antidepresivo tricíclico) y viceversa. Esta posibilidad fue planteada por el hecho de que según estudios conductuales realizados por Popik et al. (2003), podría existir una interacción entre fármacos antidepresivos y antagonistas nicotínicos. En ese trabajo se observa un efecto sinérgico entre ambas sustancias, ya que en modelos de depresión, a concentraciones bajas de imipramina, en las cuales el efecto antidepresivo es nulo, en combinación con mecamilamina el efecto farmacológico se presenta (Popik et al., 2003).

Un sinergismo se presenta cuando el efecto observado al combinar dos o más fármacos es mayor a la suma de sus efectos individuales. Dado que ambos fármacos actúan sobre los R-nic y a su vez los R-nic han sido ampliamente relacionados con la depresión, en esta parte del proyecto se estudió si el efecto sinérgico observado por Popik et al., 2003, podría deberse en alguna medida a la interacción y modulación de estas sustancias sobre los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$. Para ello, se realizaron registros electrofisiológicos de las corrientes activadas por nicotina en presencia de cada uno de los fármacos (presentado en las figuras anteriores), para posteriormente comparar cada uno de sus efectos con las corrientes obtenidas en combinación de ambas sustancias.

En la Figura 20 se ilustra la forma de aplicación de ambas sustancias. Las corrientes iónicas fueron activadas con nicotina 1 μ M la cual siguió siendo perfundida al ovocito durante todo el tiempo de registro; posteriormente se aplicó la mecamilamina y a continuación, aun en presencia de ésta, la imipramina. La mecamilamina se aplicó a una concentración que inhibió aproximadamente el 40% de la corriente control de manera individual en los experimentos anteriores (Figura 13). Por su parte, la imipramina fue aplicada a una concentración de 500 nM la cual inhibió también aproximadamente el 40% de la corriente control (Figura 17).

En particular, en la Figura 20 se observa que la magnitud del bloqueo por mecamilamina 10 nM fue aproximadamente el 30% del efecto máximo. Por su parte, la combinación de mecamilamina e imipramina con respecto al punto de inicio de

aplicación de imipramina inhibió aproximadamente el 40%. Es decir, únicamente se observó el efecto neto de la imipramina como si se aplicara de manera individual. Según lo que se plantea en la hipótesis del trabajo, se esperaría que la combinación de estas dos sustancias inhibiera más de la suma de los efectos. Sin embargo, la combinación de mecamilamina e imipramina, no inhibió más del 80% de la corriente control como si fuese un sinergismo, sino al contrario, ya que inhibió menos de la suma (60%).

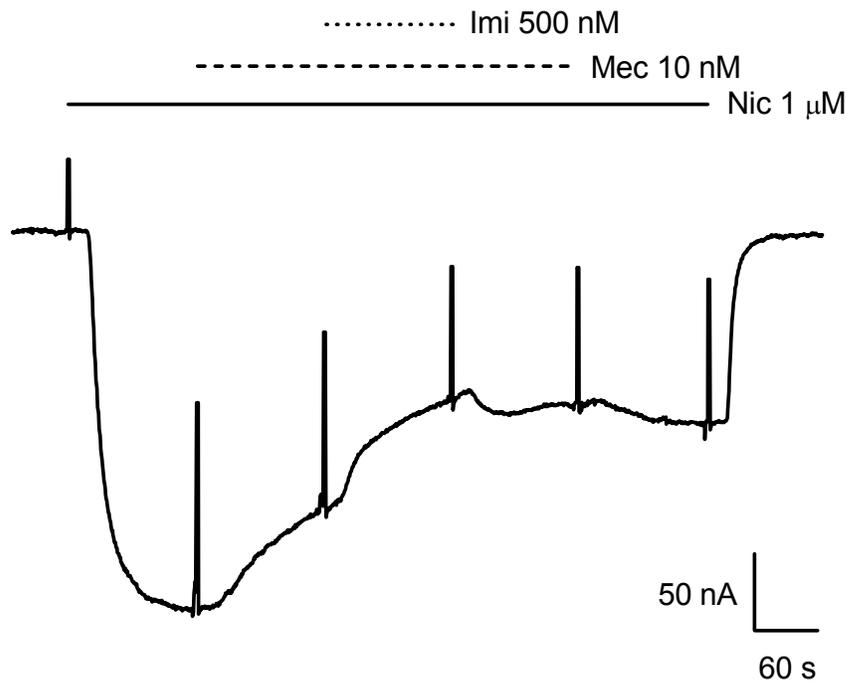


Figura 20. Efecto de la combinación de mecamilamina e imipramina sobre las corrientes activadas por nicotina. El bloqueo de la corriente activada con nicotina (Nic), por mecamilamina e imipramina. Nótese cómo, la co-aplicación de ambas sustancias a estas concentraciones cambia la tendencia de la corriente, indicando que si tienen un efecto inhibitorio. Sin embargo, la magnitud de bloqueo corresponde únicamente al efecto de la imipramina. La línea continua indica el tiempo de aplicación de nicotina 1 μ M, la línea de punteado largo indica el tiempo de aplicación de mecamilamina y la línea de punteado corto, el tiempo de aplicación de imipramina (n = 3).

Posteriormente, se realizó otra serie de experimentos, en el cual la imipramina (500 nM) fue aplicada antes que la mecamilamina (10 nM), esto con la finalidad de estudiar si el cambio en el orden de aplicación modificaba el efecto de alguna de las sustancias. Comparando los registros de las Figuras 20 y 21, se puede observar que cuando la mecamilamina es aplicada antes que la imipramina, la mecamilamina si tiene efecto inhibitorio sobre la corriente; sin embargo, cuando se aplica después de la imipramina el efecto inhibitorio de la mecamilamina ya no se observa (Figura 21).

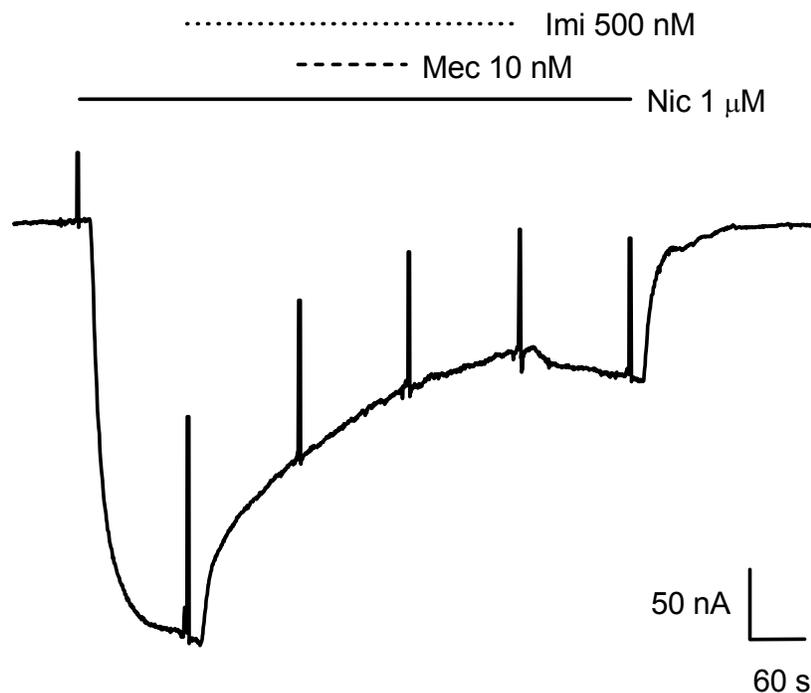


Figura 21. Efecto de la mecamilamina en R-nic inhibidos por imipramina. Se observa el efecto inhibitorio de la imipramina (Imi) sobre las corrientes inducidas con nicotina (Nic). Nótese que durante la co-aplicación de mecamilamina e imipramina, la tendencia de la corriente no se ve modificada; es decir, el efecto inhibitorio de la mecamilamina no es observado (n = 3).

Como podemos observar, la combinación de la mecamilamina y la imipramina, no produce un efecto sinérgico inhibiendo las corrientes inducidas por nicotina en R-nic $\alpha 4\beta 4$. El efecto observado podría sugerir una posible competencia por el sitio de unión

entre la mecamilamina y la imipramina, lo cual fue evaluado a continuación, variando las concentraciones tanto de mecamilamina como de imipramina.

En la primera parte de estos experimentos, se aplicaron concentraciones crecientes de mecamilamina (primera sustancia prefundida), y posteriormente se aplicó la imipramina a una concentración constante (300 nM). Los resultados obtenidos indican que sí existe competencia por el sitio de unión, ya que cuando la concentración de mecamilamina es pequeña (7 nM), el efecto inhibitorio de la imipramina puede ser observado. A medida que va aumentando la concentración de mecamilamina, ésta ya no permite que la imipramina tenga efecto inhibitorio sobre la corriente inducida por nicotina (Figura 22).

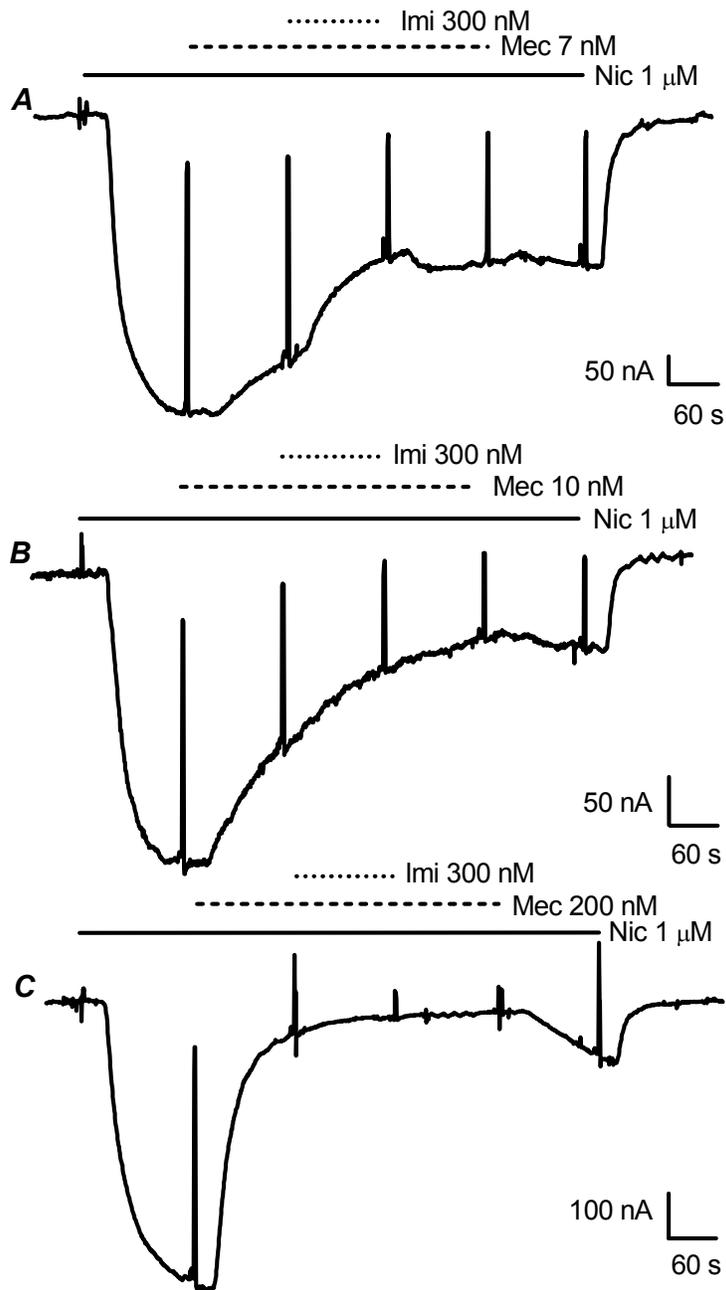


Figura 22. Aumento de la concentración de mecamilamina sobre el efecto de la imipramina. Al aumentar la concentración de mecamilamina (Mec), el efecto inhibitorio de la imipramina (Imi) va disminuyendo o se anula. **A**, con una concentración pequeña de mecamilamina (7 nM) la imipramina muestra efecto inhibitorio de la corriente. En **B** y **C**, con

altas concentraciones de mecamilamina, la imipramina ya no tiene efecto sobre la corriente iónica ya que la tendencia de la corriente inhibida por mecamilamina no es modificada.

Efectos en función del voltaje de membrana

Otro de los objetivos específicos que se estableció en este proyecto, fue evaluar la dependencia que tienen estos efectos ante variaciones en el voltaje de la membrana celular, lo cual podría ayudar a determinar el posible sitio de unión de las sustancias estudiadas. Para ello se realizaron los experimentos descritos en las Figuras 20 y 21, en ovocitos que expresaron R-nic $\alpha 4\beta 4$ con un voltaje de membrana mantenido a -60 mV, a los cuales se aplicó un protocolo de rampas de voltaje, el cual cambia el voltaje de la membrana de -140 a +40 mV en 2 s.

En la Figura 23 se ilustra el registro representativo de la aplicación de rampas de voltaje en presencia de Ringer normal (a, e), sobre la corriente inducida por nicotina (b), en presencia de mecamilamina (c) y sobre la combinación de mecamilaminian con imipramina (d), en las cuales se puede observar el mismo efecto descrito para la Figura 20, donde se ve tanto el efecto inhibitorio de 10 nM de mecamilamina como el efecto inhibitorio de 500 nM de imipramina.

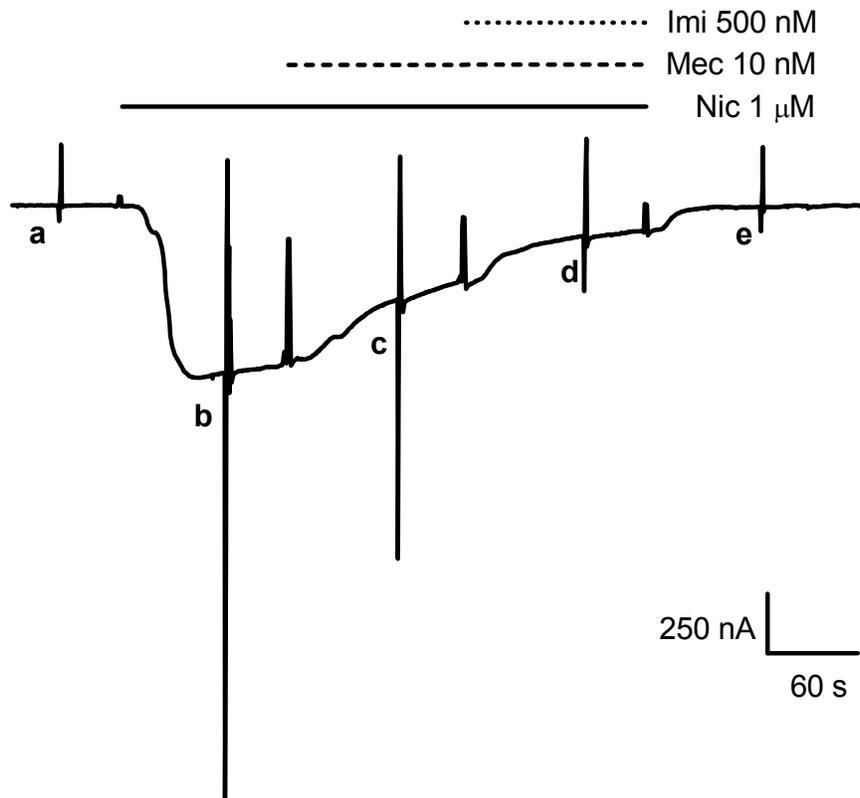


Figura 23. Efectos de mecamilamina y la combinación de mecamilamina e imipramina en función del potencial de membrana. Registro representativo de la aplicación de rampas de voltaje de -140 a +40 mV a un ovocito que expresa R-nic $\alpha 4\beta 4$, durante la perfusión de solución de Ringer normal (a), nicotina (Nic) (b), mecamilamina (Mec) (c) y la combinación de mecamilamina e imipramina (Imi) (d), finalmente se observa la aplicación de una rampa de voltaje durante la fase de recuperación, en presencia de Ringer normal (e) (n = 3).

Las relaciones de la corriente inducida por nicotina con respecto al voltaje, en presencia de mecamilamina, así como con mecamilamina más imipramina, fueron obtenidas al restar la respuesta inducida por la rampa de voltaje en presencia de Ringer normal (a), a las respuestas inducidas por las rampas de voltaje en presencia de nicotina (b), mecamilamina (c) y mecamilamina en combinación con imipramina (d). Una vez que se sustrajo el efecto de la rampa de voltaje en presencia de ringer normal, se graficaron cada uno de los efectos sobre la corriente inducida por nicotina, en presencia de mecamilamina y de la combinación de mecamilamina e imipramina. En la Figura 24

se muestran las relaciones corriente en función del voltaje de membrana, donde se observa cómo la corriente es mayor cuando sólo se aplica nicotina y disminuye en presencia de mecamilamina y más aún en presencia de la combinación de mecamilamina e imipramina; cabe mencionar que la proporción con la cual disminuye la respuesta en todos los voltajes es muy similar. Asimismo, se ve que la corriente basal se recuperó totalmente ya que las curvas a y e de la Figura 24 son casi idénticas.

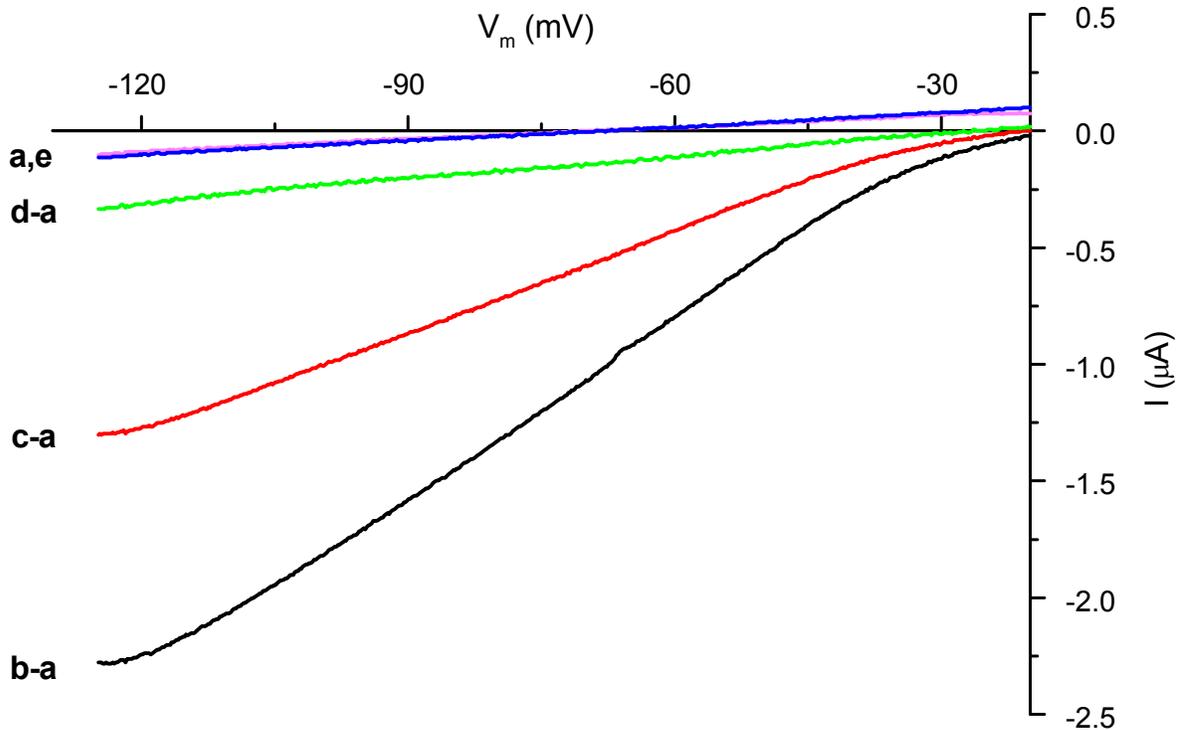


Figura 24. Relación corriente-voltaje en presencia de mecamilamina y la combinación de mecamilamina e imipramina. Relación de la corriente (I , μA) inducida por nicotina con respecto al voltaje (V_m , mV) (**b-a**), obtenida al restar la rampa en presencia de Ringer normal (**a**) a aquella en presencia de nicotina (**b**). También se muestra el efecto del voltaje sobre la corriente de nicotina en presencia de mecamilamina (**c-a**) y la combinación de mecamilamina e imipramina (**d-a**), obtenida al restar la rampa en Ringer normal (**a**) a la rampa en presencia de mecamilamina (**c**) y en la combinación de ambas sustancias (**d**). En (**e**) se muestra la rampa de recuperación obtenida durante el lavado con Ringer normal ($n = 3$).

Posteriormente, para evaluar la dependencia al voltaje se calculó la razón de la corriente en presencia de mecamilamina (c-a) entre la corriente en presencia de nicotina (b-a). A partir de esta razón (c-a)/(b-a) se obtiene una curva que indica la proporción en que se va modificando la corriente conforme varía el voltaje. Si la proporción varía conforme cambia el voltaje, se dice que el efecto depende del voltaje, si la proporción se mantiene constante en todos los voltajes, el efecto es independiente del voltaje. Los resultados mostraron que el efecto de la mecamilamina no depende del voltaje, ya que la fracción de la corriente que permanece al aplicar 10 nM de mecamilamina es muy similar a distintos voltajes: 57% a un voltaje de -130 mV y un 51% a un voltaje de -40 mV. Como se puede observar en la Figura 25 (c-a/b-a) la pendiente de la razón es muy pequeña, lo cual indica que el efecto de la mecamilamina no depende del voltaje. Para determinar el sitio de unión de la mecamilamina en el R-nic se calculó la distancia eléctrica a partir de la linearización de la ecuación:

$$I_{nic} / I_{mec} - 1 = [mecamilamina] / IC_{50}(0) * \exp(dzFV_m / RT),$$

donde: I_{nic} es la amplitud de la corriente inducida por nicotina, I_{mec} es la corriente que permanece al aplicar mecamilamina, $IC_{50}(0)$ es la concentración inhibitoria cincuenta a un voltaje de 0 mV, d es la distancia eléctrica, que corresponde a la fracción del campo eléctrico detectado en el sitio de unión de la mecamilamina dentro del canal iónico, z es la valencia de la molécula inhibitoria, F es la constante de Faraday, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta. La distancia eléctrica calculada para la mecamilamina fue de 0.057 ± 0.001 y la $IC_{50}(0)$ fue de 9.93 nM, lo cual indica que el sitio de unión de la mecamilamina está muy cercano a la entrada del canal iónico.

En cuanto a la combinación de mecamilamina e imipramina, la razón calculada (d-a/b-a), muestra que la pendiente es casi nula ya que mientras la membrana se encuentra a un voltaje de -130 mV la fracción de la corriente (después de la aplicación de mecamilamina) que permanece, es del 16%, mientras que a -40 mV es del 14%. Por lo tanto, el efecto de la combinación de mecamilamina e imipramina, tampoco depende del voltaje.

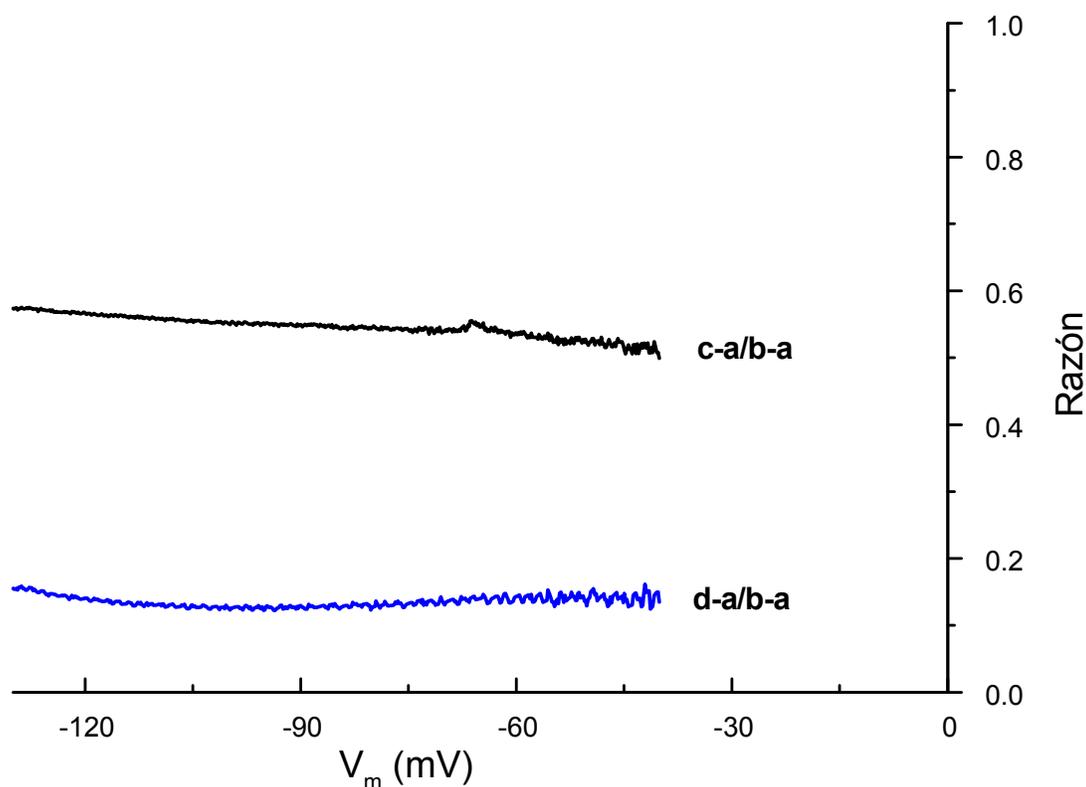


Figura 25. Dependencia de la corriente en función del voltaje. En la gráfica se muestra la razón de la corriente en presencia de mecamilamina (**c-a**), o su combinación con imipramina (**d-a**), y la corriente inducida por nicotina (**b-a**). En ambas se observa que el efecto no depende del voltaje de membrana del ovocito ($n = 3$).

Posteriormente se hizo el mismo tipo de análisis que para la sección anterior, pero ahora en el caso en que la imipramina es aplicada antes que la combinación de imipramina y mecamilamina. En la Figura 26 se ilustra la aplicación de las rampas de voltaje en presencia de Ringer normal (a, e), durante la aplicación de nicotina 1 μ M, imipramina (c) y durante la combinación de imipramina y mecamilamina (d). El efecto de la imipramina 500 nM es claro, sin embargo, el efecto de la mecamilamina ya no se observa al co-aplicarse con imipramina.

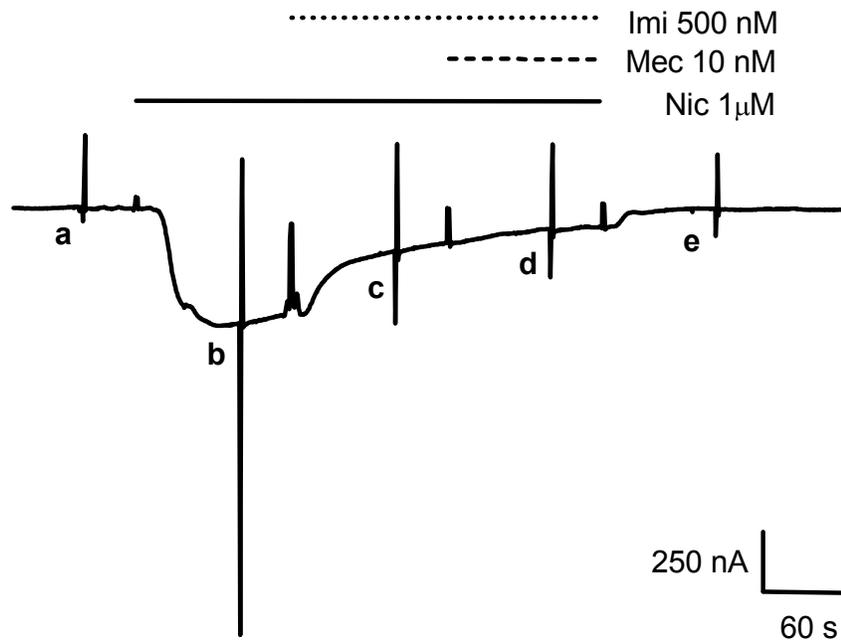


Figura 26. Efectos de imipramina y la combinación de imipramina y mecamilamina en función del potencial de membrana. Registro representativo de la aplicación de rampas de voltaje de -140 a +40 mV en un ovocito que expresa los R-nic $\alpha 4\beta 4$, durante la perfusión de solución de Ringer normal **(a)**, nicotina (Nic) **(b)**, imipramina (Imi) **(c)** y la combinación de imipramina y mecamilamina (mec) **(d)**, durante la fase recuperación en presencia de Ringer normal **(e)** (n = 3).

La relación de la corriente inducida por nicotina con respecto al voltaje, en presencia de imipramina y la combinación de imipramina con mecamilamina, fueron obtenidas al restar la respuesta inducida por la rampa de voltaje en presencia de Ringer normal (a), a las respuestas inducidas por las rampas de voltaje en presencia de nicotina (b), imipramina (c) y la combinación de imipramina y mecamilamina (d). Una vez que se sustrajo el efecto de la rampa de voltaje en presencia de ringer normal, se graficaron cada uno de los efectos sobre la corriente inducida por nicotina, en presencia de imipramina (c-a) y de la combinación de imipramina y mecamilamina (d-a). En la Figura 27 se muestra la relación de la corriente en función del voltaje de membrana, en la cual se observa que la corriente inducida sólo por la presencia de nicotina 1 μM (b-a), es mayor que la corriente en presencia de imipramina (c-a); además la combinación de

imipramina y mecamilamina, no tiene un efecto inhibitorio tan grande con respecto al efecto de la imipramina aplicada de manera individual, en comparación con lo que sucede cuando la mecamilamina es la primera en ser aplicada (Figura 24, d-a).

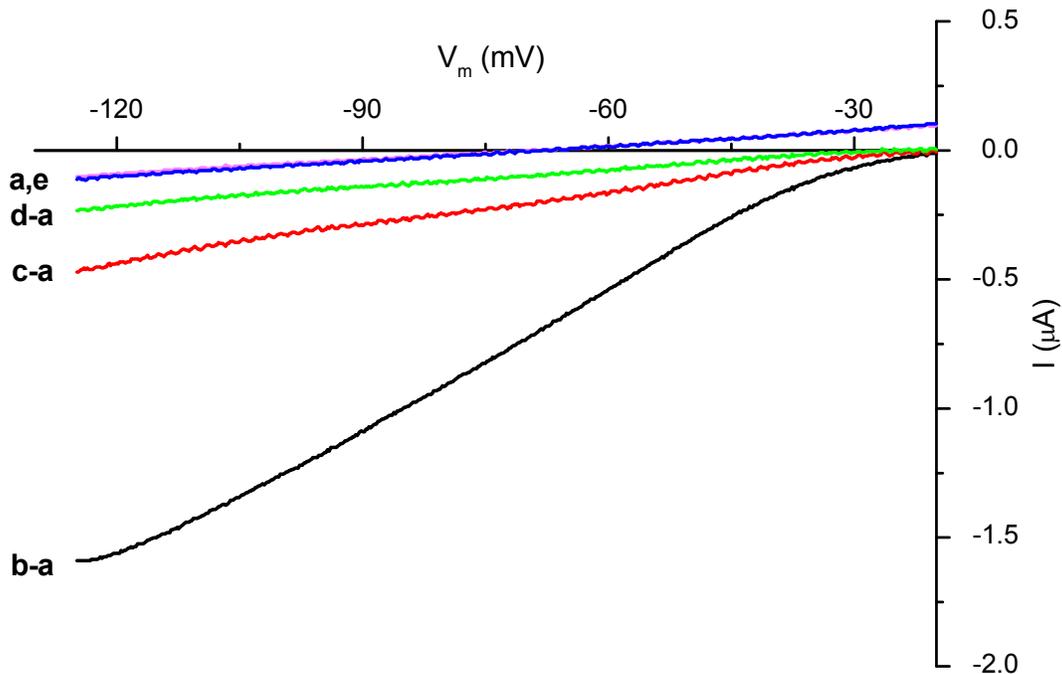


Figura 27. Relación corriente-voltaje en presencia de imipramina y la combinación de imipramina y mecamilamina. Relación de la corriente (μA) inducida por nicotina con respecto al voltaje (mV) (**b-a**), obtenida al restar la rampa en presencia de Ringer normal (**a**) a aquella en presencia de nicotina (**b**). También se muestra el efecto del voltaje sobre la corriente de nicotina en presencia de imipramina (**c-a**) y la combinación de imipramina y mecamilamina (**d-a**), obtenidas al restar la rampa en Ringer normal (**a**) a la rampa en presencia de imipramina (**c**) y en la combinación de ambas sustancias (**d**). En (**e**) se muestra la rampa de recuperación obtenida durante el lavado con Ringer normal ($n = 3$).

Finalmente se evaluó la dependencia al voltaje, para lo cual se calculó la razón de la corriente en presencia de imipramina (c-a) entre la corriente en presencia de nicotina (b-a). A partir de esta razón (c-a)/(b-a) se obtiene la proporción en la cual se va modificando la corriente conforme varía el voltaje. Los resultados mostraron que el efecto de la imipramina es ligeramente dependiente del voltaje, ya que la fracción de la

corriente que permanece al aplicar 500 nM de imipramina varía muy poco: 32% a un voltaje de -130 mV, 26% a -100 mV y 33% a un voltaje de -50 mV. Como se puede observar en la Figura 28 (c-a/b-a) el trazo no es lineal, ya que tiene variaciones en su pendiente a distintos intervalos de voltaje, por lo cual el efecto de la imipramina depende ligeramente del voltaje. La distancia eléctrica calculada fue de 0.093 ± 0.004 , sugiriendo que el sitio de unión de la imipramina es cercano a la entrada del canal iónico del R-nic. La $IC_{50}(0)$ fue de 269.6 nM.

En cuanto a la combinación de mecamilamina e imipramina, la razón calculada (d-a/b-a), muestra que el trazo es casi recto, ya que mientras la membrana se encuentra a un voltaje de -130 mV la fracción de la corriente que permanece es del 17%, mientras que a -50 mV es del 15%. Por lo tanto, el efecto de la combinación de mecamilamina e imipramina, depende muy poco del voltaje.

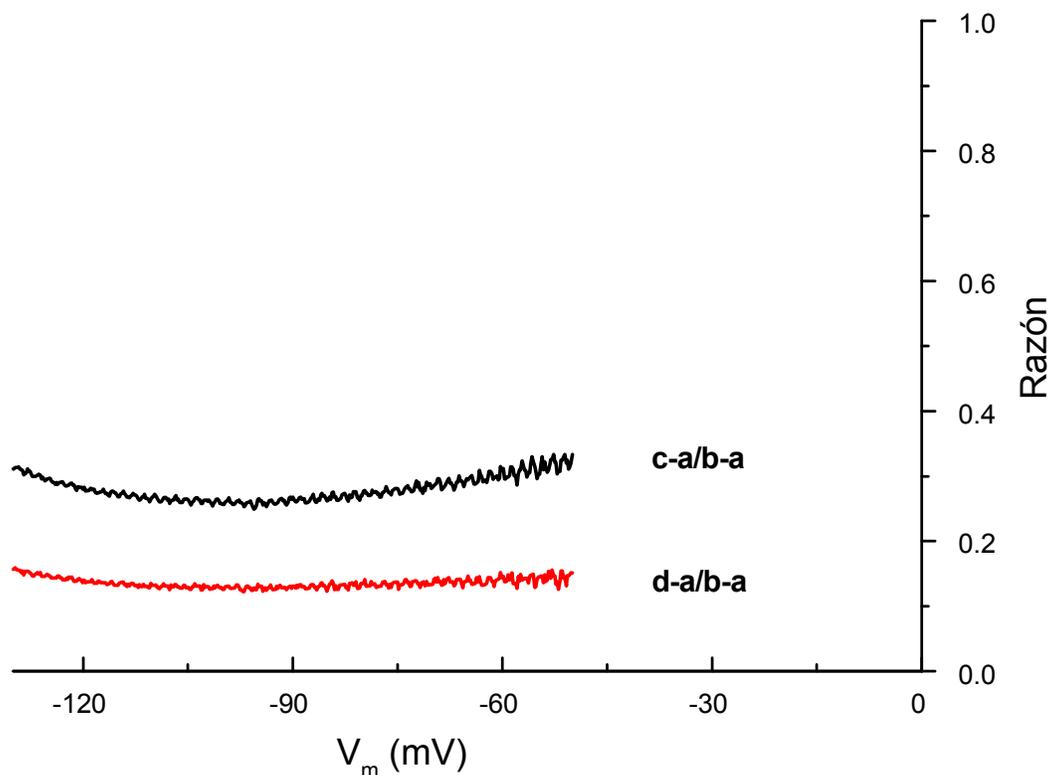


Figura 28. Dependencia de la corriente en función del voltaje. En la gráfica se muestra la razón de la corriente en presencia de imipramina (**c-a**), o su combinación con mecamilamina (**d-a**), y la corriente inducida por 1 μ M de nicotina (**b-a**). Se observa que el efecto inhibitorio de la imipramina depende ligeramente del voltaje de membrana ($n = 3$).

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue determinar si el efecto de la mecamilamina en R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$, es modificado por la imipramina, y viceversa. En particular, se estudió si existe un efecto sinérgico entre la mecamilamina y la imipramina, ya que con base en los antecedentes citados, se sugiere que el efecto sinérgico observado en el modelo conductual de depresión, es debido a la modulación de los R-nic por estas sustancias (Popik et al., 2003).

En la actualidad existe una gran variedad de estudios en los que se sugiere que los R-nic participan de alguna manera en la fisiopatología de la depresión, ya que según la hipótesis colinérgica de la depresión, se plantea que durante la depresión existe un aumento en la transmisión mediada por AcCo. De esta forma, se podría pensar que una de las alternativas terapéuticas para tratar la depresión sería a través de la modulación los receptores de este sistema, en especial a los R-nic.

La nicotina es una de las sustancias que actúan sobre R-nic y además se ha visto que tiene efectos antidepresivos; si bien la nicotina es un agonista de R-nic, resulta contradictorio pensar que su mecanismo de acción en la depresión es por la inhibición de estos receptores. Sin embargo, uno de los mecanismo por el cuál se podría llevar a cabo este efecto, es mediante la modulación de R-nic presinápticos. En este sentido, se sabe que la nicotina promueve la liberación de neurotransmisores que están disminuidos durante la depresión, tales como la NE, DA y 5-HT en estructuras del sistema límbico, el cual ha sido asociado con el establecimiento del estado emocional (Zoli et al., 2002; Covernton y Lester, 2002; O'Leary et al., 2003; Sher et al., 2004).

Por otra parte, la nicotina está muy relacionada con la depresión ya que, siendo el principal componente del cigarro, tiene efecto antidepresivo en personas que lo consumen. Asimismo, se sabe que personas que dejan de fumar, son más propensas a desarrollar cuadros de depresión (Fakhfakh y Lagrue, 2002; Killen et al., 2003). En este sentido se piensa que cuando los niveles de nicotina en el sistema nervioso de los fumadores se mantienen constantes, y en consecuencia los R-nic permanecen en continua presencia de la misma, la nicotina los desensibiliza. Se ha visto que la exposición de distintos subtipos de R-nic a concentraciones bajas de nicotina durante un tiempo prolongado, puede provocar su inactivación, la cual puede llegar a ser

irreversible (Marks et al., 1994; Olale et al., 1997). De esta manera, se pensaría que el grado de activación postsináptica de los R-nic es menor, y en consecuencia el sistema colinérgico se encontraría menos activado, reestableciendo así la sobreactivación existente durante la depresión.

Dada la importancia de la nicotina y su relación con efectos antidepresivos, quisimos evaluar cuál es el papel de la misma actuando sobre los R-nic del tipo $\alpha 4\beta 4$. En este proyecto se evaluó el efecto de la nicotina en función de su concentración, y se obtuvo una relación en forma de campana, en la cual se tiene un punto máximo de respuesta con 100 μM y a concentraciones mayores, la magnitud de la corriente va disminuyendo. La EC_{50} fue de $50 \pm 13.68 \mu\text{M}$ para este subtipo. Cabe mencionar que la EC_{50} cambia dependiendo del subtipo de R-nic, por ejemplo, en R-nic $\alpha 7$ de humano se ha encontrado que la EC_{50} es de $91 \pm 13 \mu\text{M}$ (Briggs y McKenna, 1998). Esto resulta interesante desde el punto de vista funcional, ya que dependiendo de las concentraciones de nicotina presente, se activarán preferentemente algunos subtipos de R-nic, cumpliendo así con sus funciones en el sistema nervioso.

Por otra parte, se sabe que existen agonistas que actúan preferentemente sobre un subtipo de R-nic (Chávez-Noriega et al., 1997). En una parte de este trabajo, se evaluó la potencia de la AcCo y la nicotina al activar R-nic $\alpha 4\beta 4$, y se observó que la nicotina es aproximadamente cuatro veces más potente que la AcCo, lo cual concuerda con lo reportado por Chávez-Noriega, para los R-nic $\alpha 4\beta 4$ de humano (Chávez-Noriega et al., 1997). Sin embargo la EC_{50} de nicotina en ese estudio fue de 5.02 μM , comparada con la obtenida en nuestra curva, la cual fue de $50 \pm 13.68 \mu\text{M}$. Esto podría deberse a que a diferencia de los estudios realizados por nosotros, los R-nic fueron obtenidos de cerebro humano y no de rata.

Otra de las sustancias evaluadas fue la mecamilamina, la cual es un antagonista de R-nic y además se le ha atribuido propiedades antidepresivas (Shytle et al., 2002). Los resultados obtenidos al realizar la relación concentración de mecamilamina en función de su concentración, mostraron que la IC_{50} de la mecamilamina es de $12.2 \pm 2.1 \text{ nM}$. En un estudio realizado por Papke et al., 2001, se encontró que la IC_{50} para los subtipos $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ es de 640 nM y 2.5 μM , respectivamente; comparándolas con la obtenida en este proyecto, se puede apreciar que la mecamilamina es más potente en

los R-nic del subtipo $\alpha 4\beta 4$. Se piensa que los R-nic que contienen a la subunidad $\alpha 4$, son más afines a la mecamilamina, y que además el segundo dominio transmembranal de esta subunidad, regula la sensibilidad de los R-nic a la mecamilamina (Webster et al., 1999). En este proyecto se observó que efectivamente, la mecamilamina es muy potente inhibiendo a los R-nic $\alpha 4\beta 4$, comparada con la IC_{50} en homómeros $\alpha 7$, la cual es de $6.9 \mu M$ (Papke et al., 2001).

Se sabe que la potencia de un fármaco depende, en parte, de la afinidad (K_D) del fármaco para unirse al receptor, y en parte de la eficiencia con la cual la interacción fármaco-receptor se acopla a la respuesta, además de que tanto la afinidad como la eficiencia del acoplamiento contribuyen a la IC_{50} (Bourne, 1999). Según lo anterior, la mecamilamina es más potente sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$ que sobre los R-nic $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$, y por lo tanto existe más afinidad de la mecamilamina por los R-nic $\alpha 4\beta 4$.

Posteriormente, se realizaron experimentos en los que se midió el tiempo de lavado o recuperación de la corriente, tiempo en el cual se elimina el efecto inhibitorio de la mecamilamina. Así se observó que el tiempo en el cual se elimina el efecto inhibitorio de la mecamilamina depende de la concentración utilizada, ya que con 50 nM el tiempo de lavado fue de 4.5 min y con 500 nM de 6 min .

En el estudio realizado por Papke et al., 2001, el tiempo que tarda en recuperarse la corriente después de aplicar mecamilamina $10 \mu M$, es de $33 \pm 4 \text{ min}$ para el R-nic $\alpha 3\beta 2$. En el mismo estudio, la recuperación para el subtipo $\alpha 4\beta 2$ fue más rápida ($23 \pm 1.2 \text{ min}$). Además, en contraste con lo que sucede en R-nic que contienen la subunidad $\beta 2$, la recuperación de la corriente en el subtipo $\alpha 3\beta 4$ es aún más rápida ($12 \pm 1.3 \text{ min}$) (Papke et al., 2001), y aún es más rápida para los R-nic $\alpha 4\beta 4$ estudiados en este proyecto, en los que la respuesta se recuperó en aproximadamente 6 min , utilizando una concentración que inhibió aproximadamente el 90% de la corriente.

Por otra parte, se evaluó si la mecamilamina actuaba como un antagonista competitivo o no sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$, es decir, si el efecto inhibitorio disminuía o no, respectivamente conforme se aumentaba la concentración de nicotina. Nuestros resultados muestran que la mecamilamina actúa como un antagonista no-competitivo sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$, al igual que sobre los R-nic $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ musculares, así como sobre los $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ neuronales, evaluados en otros estudios (Varanda et al., 1985;

Giniatullin et al., 2000; Papke et al., 2001). Además, el efecto inhibitorio no sólo es de la misma magnitud, sino que llega a ser mayor. Así se aprecia que la mecamilamina inhibe aún más a concentraciones mayores de nicotina. Sin embargo, esto se puede explicar con base al grado de desensibilización que tienen los R-nic a concentraciones mayores de nicotina, ya que cuando se aplica una concentración de 1 μM , el decaimiento de la corriente es menor que para 5 y 20 μM , por lo que se suma ese evento al efecto inhibitorio de la mecamilamina. Estos resultados indican que la mecamilamina tiene un sitio de unión distinto al de la nicotina, ya que aun cuando se aumenta la concentración de nicotina el efecto inhibitorio de la mecamilamina no se ve disminuido.

Al evaluar el efecto inhibitorio de la mecamilamina en función del voltaje de membrana sobre la corriente inducida por nicotina, se encontró que su efecto no depende del voltaje. Al calcular la distancia eléctrica, parámetro que estima qué tan cercano del canal iónico está el sitio de unión de la sustancia estudiada, se encontró que este valor fue de ~ 0.06 . Lo que sugiere que el sitio de unión de la mecamilamina sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$, no está en el interior del canal del receptor, sino más bien muy cercano a la entrada del canal iónico. Sin embargo, existen evidencias en que el efecto de la mecamilamina sí depende del voltaje de la membrana en otros subtipos de R-nic, como $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$, lo cual indica que la mecamilamina se une dentro del canal del receptor (Webster et al., 1999; Papke et al., 2001). Esto manifiesta que la mecamilamina tiene distintos sitios de unión, dependiendo del subtipo de R-nic. Asimismo, se calculó la IC_{50} a un voltaje de 0 mV la cual fue de 9.93 nM, que siendo comparada con aquella a un voltaje de -60 mV la cual fue de 12.2 nM, podemos percibir que la mecamilamina es ligeramente más afín al R-nic $\alpha 4\beta 4$ a un voltaje de 0 mV.

Por otro lado, diversos estudios muestran que existe una gran variedad de antidepresivos que inhiben a los R-nic (García-Colunga et al., 1997; Fryer y Lukas, 1999; López-Valdés y García-Colunga, 2001; López-Valdés et al., 2002). Al evaluar el efecto de la imipramina sobre las corrientes iónicas inducidas por nicotina en los R-nic $\alpha 4\beta 4$, se encontró que efectivamente, la imipramina tiene un efecto inhibitorio.

Así, se evaluó el efecto inhibitorio de la imipramina en función de la concentración sobre R-nic $\alpha 4\beta 4$, y se obtuvo una IC_{50} de $1.16 \pm 0.26 \mu\text{M}$. La IC_{50}

obtenida para R-nic $\alpha 2\beta 4$ neuronal es $3.65 \pm 0.30 \mu\text{M}$ y para R-nic $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ muscular es de $5.57 \pm 0.19 \mu\text{M}$ (López-Valdés y García-Colunga, 2001); comparándola con la IC_{50} obtenida en este estudio para el subtipo neuronal $\alpha 4\beta 4$, se puede apreciar que la potencia de la imipramina es mayor en los R-nic neuronales que en los musculares, y sobre todo en los R-nic $\alpha 4\beta 4$. Esto podría tener un significado funcional muy importante ya que se ha relacionado a los R-nic neuronales con la depresión; dado que los R-nic $\alpha 4\beta 4$ son uno de los subtipos más abundantes en estructuras del sistema límbico, el cual se ha asociado al establecimiento del estado emocional (Quik et al., 2000; Milak et al., 2005; Nicolaidis, 2005), una forma de disminuir los síntomas de la depresión, sería mediante la inhibición de los R-nic. Dado que la potencia de la imipramina sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$ es alta, resulta interesante pensar que este subtipo de R-nic podría ser uno sobre los cuáles la imipramina actúa, para finalmente desarrollar un efecto antidepresivo.

Por otra parte, al evaluar si la imipramina actuaba como una antagonista competitivo o no sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$, se encontró que la imipramina actúa de manera no competitiva con la nicotina, al igual que lo reportado por López-Valdés y García-Colunga, 2001, sugiriendo que este antidepresivo se une en un sitio distinto al de la nicotina y la AcCo. Al parecer, el mecanismo por el cual diversos antidepresivos inhiben a los R-nic es de manera no-competitiva, ya que se ha visto que sucede lo mismo con la sertralina, la paroxetina, la nefazadona, la venlafaxina y la fluoxetina en distintos subtipos de R-nic (García-Colunga et al., 1997; Fryer y Lukas, 1999).

Al estudiar si el efecto inhibitorio de la imipramina dependía del voltaje de la membrana del ovocito, se observó que su efecto depende ligeramente del voltaje. De tal manera que el sitio de unión podría estar muy cercano a la entrada del canal iónico del R-nic $\alpha 4\beta 4$. Al calcular la distancia eléctrica, se obtuvo un valor de ~ 0.09 , lo cual indica que efectivamente el sitio de unión de la imipramina no está dentro del canal del R-nic, sino posiblemente en el vestíbulo del mismo. Esto coincide con otro estudio en el cual se encontró que el efecto de la imipramina también depende ligeramente del voltaje de membrana en los subtipos $\alpha 2\beta 4$ y $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, calculándose una distancia eléctrica de ~ 0.10 y ~ 0.12 , respectivamente (López-Valdés y García-Colunga, 2001). Asimismo, si comparamos las IC_{50} a los voltajes de membrana de -60 y de 0 mV, se

puede apreciar que el voltaje no influye tanto el efecto inhibitorio de la mecamilamina como en el caso de la imipramina, ya que la imipramina es más afín al R-nic a un voltaje de 0 mV que de - 60 mV.

Por otra parte, comparando la potencia de la mecamilamina con respecto a la imipramina, con base a la IC_{50} , la mecamilamina es aproximadamente 100 veces más potente para inhibir a los R-nic $\alpha 4\beta 4$. Esto resulta interesante ya que se ha visto que la mecamilamina tiene efectos antidepresivos, los cuáles podrían deberse al efecto inhibitorio que tiene sobre los R-nic. Se ha visto que cuando la mecamilamina es evaluada sobre ratas “knockout” para la subunidad $\beta 2$ de los R-nic, no se observa el efecto antidepresivo que tiene sobre ratas controles (Caldarone et al., 2004). Es importante señalar que al administrar bajas dosis de mecamilamina, en conjunto con bajas dosis de imipramina, las cuales por sí mismas no tienen efecto antidepresivo; la combinación de ambas sustancias, producen un efecto sinérgico que mejora la conducta depresiva en un modelo conductual en la rata (Popik et al., 2003). Si el sinergismo antidepresivo fuera mediante la inhibición de los R-nic, se podría diseñar una nueva estrategia terapéutica, en la cual se combinaran bajas dosis de fármacos antidepresivos como la imipramina, con bajas dosis de antagonistas de R-nic como la mecamilamina, con lo cual se podrían reducir muchos de los efectos secundarios que tiene la administración de las dosis de antidepresivos actualmente suministradas.

Si bien, existen evidencias que muestran que la combinación de estas sustancias tiene un efecto antidepresivo más evidente que cuando se administran individualmente, el mecanismo por el cual se lleva a cabo aun no está claro. Dado que ambas actúan inhibiendo a los R-nic, y teniendo en cuenta que durante la depresión está sobreactivado el sistema colinérgico (Janowsky et al., 1972; Hasey y Hanin, 1991; Shytle et al, 2002) uno de los mecanismo probables podría ser que la combinación de estas sustancias ocasiona una inhibición mayor sobre los R-nic, que aquella inhibición resultante de la suma de los efectos de ambos fármacos.

Una de las formas de estudiar si la inhibición dada por la combinación de ambas sustancias es sinérgica, es evaluando el efecto de ambas sobre las corrientes iónicas inducidas por agonistas en R-nic. En este proyecto, utilizamos a la mecamilamina y a la imipramina para evaluar este posible efecto y encontramos que contrario a la hipótesis

planteada, los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, no son inhibidos sinérgicamente por la combinación de mecamilamina e imipramina.

Contrario a lo que sucede cuando se da un sinergismo entre dos fármacos, puede ser que exista una competencia entre éstos por el mismo sitio de unión, de tal manera que el efecto inhibitorio de un fármaco se vea disminuido por la presencia del otro. Los resultados de competitividad entre la mecamilamina y la imipramina realizados en este proyecto, muestran que el efecto inhibitorio de la segunda sustancia aplicada, no es apreciado cuando su concentración inhibe por debajo del porcentaje que inhibe la primera. Esto es, conforme se va aumentando la concentración de la primer sustancia aplicada, el efecto de la segunda (sea imipramina o mecamilamina) no es apreciado.

Asimismo, se observó que el efecto de la combinación de ambas sustancias no depende del voltaje, lo cual sugiere que al igual que como sucede al aplicarse ambas sustancias de manera individual, la unión de ambas a su sitio de unión, sigue siendo fuera del canal del R-nic $\alpha 4\beta 4$.

Hablando en términos clínicos, los niveles de imipramina en plasma de pacientes tratados con dosis de 300 mg/día alcanzan una concentración de 1.57 μM (Garvey et al., 1991). Cabe mencionar que el nivel de otros antidepresivos como la fluoxetina, llega a ser 20 veces mayor en el SNC que en el plasma (Karson et al., 1993). Esto es relevante si consideramos que la concentración de imipramina utilizada en el proyecto es mucho menor, quizás lo que esté sucediendo es que la concentración utilizada no es lo suficientemente potente como para que se muestre el efecto sinérgico con la coaplicación de mecamilamina.

Otra posibilidad es que este subtipo de R-nic no sea el responsable de que se lleve a cabo el sinergismo observado en el estudio realizado por Popik et al., 2003. Según el grupo de Picciotto, el efecto antidepresivo de la amitriptilina, la cual pertenece al grupo de los antidepresivos de la imipramina (antidepresivos tricíclicos), depende fuertemente de la presencia de los subtipos de R-nic que contienen a la subunidad $\beta 2$ (Caldarone et al., 2004). Sería interesante probar si el efecto sinérgico también depende de esta subunidad. Para ello se podría realizar el mismo experimento realizado por Popik et al., 2003 en ratones “knockout” para la subunidad $\beta 2$. Por otra parte, cabe señalar que la metodología seguida en ambos estudios es muy diferente, ya

que el trabajo realizado por Popik et al., 2003 aborda el sinergismo entre la mecamilamina y la imipramina desde un punto de vista conductual, en el cual participan una variedad de neurotransmisores y receptores, mientras que en este proyecto el enfoque fue en particular sobre un solo subtipo de R-nic. Sin embargo, también es importante realizar estudios a este nivel, en el cual podemos evaluar cuál es el comportamiento de un receptor específico ante la presencia de distintas sustancias.

Una explicación por la cual los R-nic pudieran estar participando durante el tratamiento con antidepresivos, es que la activación de R-nic a nivel presináptico modula la liberación de los neurotransmisores que están disminuidos en la depresión, tal como es el caso de la NE, DA y 5-HT. Esto tiene lógica tomando en cuenta que se ha visto que la nicotina, la cual tiene efectos antidepresivos, aumenta la liberación de 5-HT en neuronas del rafe dorsal (Mihailescu et al., 1998).

Si bien el sistema serotoninérgico es de gran importancia para el establecimiento del estado de ánimo, también se requiere de un balance de éste con los demás sistemas, dentro de los que se encuentra el colinérgico. Quizá lo que esté sucediendo en la depresión es que existe un desbalance de neurotransmisores, y que la modulación entre éstos para reestablecer los niveles es lo que lleva a la desaparición de los síntomas.

Los resultados obtenidos incrementan las evidencias acerca de la modulación que tienen los R-nic por distintas sustancias con efecto antidepresivo, tal es el caso de la nicotina, la mecamilamina y la imipramina. Asimismo, es importante señalar que éste es el primer trabajo en el cual se estudia la combinación de este tipo de sustancias, para evaluar su posible sinergismo al actuar sobre R-nic. Los resultados muestran que el sinergismo observado a nivel conductual por Popik et al., 2003, no se reproduce a nivel celular y molecular en particular sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$. Esto puede deberse a la diferencia en los modelos de estudio, ya que la conducta de un animal depende de múltiples factores, tales como distintos neurotransmisores, receptores, canales iónicos y transportadores y la interacción entre éstos. Sin embargo, podría ser que este subtipo de R-nic no sea el implicado directamente en que el sinergismo se lleve a cabo, por lo que sería interesante realizar más estudios en los cuales se evalúe la combinación de otros antagonistas de R-nic y antidepresivos, sobre distintos subtipos de R-nic.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La nicotina tiene su efecto máximo sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$ a una concentración 100 μM , a partir de la cual la corriente disminuye conforme aumenta su concentración. La EC_{50} de nicotina es de $50 \pm 13.68 \mu\text{M}$.
2. La mecamilamina inhibe las corrientes inducidas por nicotina en R-nic $\alpha 4\beta 4$ dependiendo de su concentración, con una IC_{50} de $12.2 \pm 2.1 \text{ nM}$.
3. El tiempo en el cual se recupera la corriente iónica del efecto inhibitorio de la mecamilamina, depende de su concentración. El tiempo fue de 6 min para 500 nM de mecamilamina, la cual inhibe aproximadamente el 90 % de la corriente.
4. La imipramina tiene un efecto inhibitorio sobre los R-nic $\alpha 4\beta 4$, el cual depende de su concentración. La IC_{50} es $1.16 \pm 0.26 \mu\text{M}$.
5. La mecamilamina y la imipramina actúan como antagonistas no-competitivos en los R-nic $\alpha 4\beta 4$ activados con nicotina.
6. El efecto de la mecamilamina no depende del voltaje de membrana, mientras que el efecto de la imipramina depende ligeramente del mismo; las distancias eléctricas calculadas fueron de ~ 0.06 y ~ 0.09 , respectivamente.
7. La mecamilamina es aproximadamente 100 veces más potente que la imipramina para inhibir a los R-nic $\alpha 4\beta 4$.
8. Los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, no son inhibidos sinérgicamente por la combinación de mecamilamina e imipramina, además existe competencia entre estas dos sustancias.

X. CONCLUSIONES

Los R-nic neuronales $\alpha 4\beta 4$, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*, son modulados por el antagonista nicotínico mecamilamina y por el antidepresivo imipramina al ser aplicados de manera individual, teniendo ambos un efecto inhibitorio sobre las corrientes iónicas inducidas por nicotina. Estos efectos son ejercidos por la interacción de estas sustancias en un dominio extracelular de la proteína, diferente del sitio de acción de la nicotina o la AcCo, ya que la inhibición es no competitiva y muy poco dependiente del potencial transmembranal. Al contrario de lo que sucede en estudios conductuales en modelos animales de depresión, su combinación no produce un efecto inhibitorio sinérgico sobre las corrientes iónicas inducidas con nicotina en R-nic $\alpha 4\beta 4$, infiriendo así que la interacción de los diversos sistemas en los que se incluyen distintos receptores y transportadores a neurotransmisores, es esencial para modificar el medio interno cerebral y a su vez éste se vea reflejado en un cambio conductual. Sin embargo, es evidente que los R-nic son un fuerte blanco de acción para los antidepresivos, por lo que es importante continuar con estudios que permitan conocer a profundidad el funcionamiento de los mismos, lo cual será de gran ayuda para el desarrollo de óptimos agentes terapéuticos para la depresión.

XI. REFERENCIAS

- Agurell S. Biogenic amines and depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 1981; **290**:17-19.
- Alkondon M, Albuquerque EX. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog Brain Res.* 2004; **145**:109-120.
- Avila A, Cardona X, Martin-Baranera M, Maho P, Sastre F, Bello J. Does nefazodone improve both depression and Parkinson disease? A pilot randomized trial. *J Clin Psychopharmacol.* 2003; **23**:509-513.
- Baldessarini RJ. Fármacos y tratamiento de los trastornos psiquiátricos. Depresión y manía. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Goodman and Gilman. 2000; 459-475.
- Banerjee S, Punzi JS, Kreilick K, Abood LG. [3H] mecamylamine binding to rat brain membranes. Studies with mecamylamine and nicotine analogues. *Biochem Pharmacol.* 1990; **40**:2105-2110.
- Barchas JD, Hamblin MW, Malenka RC. Biochemical Hypotheses of Mood and Anxiety Disorders. En: *Basic Neurochemistry.* 5th edition, Siegel et al. 1994; 979-1001.
- Beasley CM Jr, Holman SL, Potvin JH. Fluoxetine compared with imipramine in the treatment of inpatient depression. A multicenter trial. *Ann Clin Psychiatry.* 1993; **5**:199-207.
- Bernstein S. Serial observations on the physiological and psychological changes in patients reacting with a depression to reserpine. *Mt Sinai Hosp N Y.* 1957; **24**:89-96.
- Bourne HR. Receptores de fármacos y farmacodinamia. Katzung BG. En: *Farmacología básica y clínica.* 1999: 34-36.
- Bouzat C, Barrantes F, Sine S. Nicotinic receptor fourth transmembrane domain: hydrogen bonding by conserved threonine contributes to channel gating kinetics. *J Gen Physiol.* 2000; **115**:663-672.
- Boyd RT, Jacob MH, McEachern AE, Caron S, Berg DK. Nicotinic acetylcholine receptor mRNA in dorsal root ganglion neurons. *J Neurobiol.* 1991; **22**:1-14.
- Brandstadter D, Oertel WH. Depression in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 2003; **91**:371-381.

- Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*. 2001; **411**:252-255.
- Briggs CA, McKenna DG. Activation and inhibition of the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by agonists. *Neuropharmacology*. 1998; **37**:1095-1102.
- Burrell RH. Depression associated with reserpine therapy. *N Z Med J*. 1956; **55**:228-231.
- Caldarone BJ, Harrist A, Cleary MA, Beech RD, King SL, Picciotto MR. High-affinity nicotinic acetylcholine receptors are required for antidepressant effects of amitriptyline on behavior and hippocampal cell proliferation. *Biol Psychiatry*. 2004; **56**:657-664.
- Changeux JP. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci*. 1990; **11**:485-492.
- Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Johnson EC. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ and $\alpha 7$ expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; **280**:346-356.
- Conroy WG, Berg DK. Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J Biol Chem*. 1995; **270**:4424-4431.
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000; **40**:431-458.
- Covernton PO, Lester RA. Prolonged stimulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the rat interpeduncular nucleus has differential effects on transmitter release. *Int J Dev Neurosci*. 2002; **20**:247-258.
- Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001; **70**:439-446.
- Dani JA. Structure, diversity, and ionic permeability of neuronal and muscle acetylcholine receptors. *EXS*. 1993; **66**:47-59.
- De Freitas RL, de Oliveira RC, de Carvalho AD, Felippotti TT, Bassi GS, Elias-Filho DH, Coimbra NC. Role of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors in an

- experimental model of epilepsy-induced analgesia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004; **79**:367-376.
- Dineley-Miller K, Patrick J. Gene transcripts for the nicotinic acetylcholine receptor subunit, beta4, are distributed in multiple areas of the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992; **16**:339-344.
- Fakhfakh R, Lagrue G. Depression, tobacco dependence and nicotine. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 2002; **79**:65-72.
- Fatt P y Katz B. Some problems of neuro-muscular transmission. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1952; **17**:275-280.
- Ferguson SM, Brodtkin JD, Lloyd GK, Menzaghi F. Antidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression. *Psychopharmacology.* 2000; **152**:295-303.
- Frances A, Pincus HA, First MB. Mood disorders. En: *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)*. Fourth edition. 1994; 317-338.
- Freis ED. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. *N Engl J Med.* 1954; **251**:1006-1008.
- Fryer JD, Lukas RJ. Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurochem.* 1999; **72**:1117-1124.
- García-Colunga J, Awad JN y Miledi R. Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; **94**:2041-2044.
- Garcia-Colunga J, Miledi R. Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; **92**:2919-2923.
- Garvey M, DeRubeis RJ, Hollon SD, Evans MD, Tuason VB. Response of depression to very high plasma levels of imipramine plus desipramine. *Biol Psychiatry.* 1991; **30**:57-62.
- Geneeskde NT. Classical monoamine oxidase inhibitor: not registered for, but still a place in the treatment of depression. 2003; **147**:1937-1940.
- Gershon S, Newton R. Lack of anticholinergic side effects with a new antidepressant-trazodone. *J Clin Psychiatry.* 1980; **41**:100-104.

- Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G, Anand R, Fletcher S, Lindstrom J. Comparative pharmacology of epibatidine: a potent agonist for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. 1995; **48**:774-782.
- Giniatullin RA, Sokolova EM, Di Angelantonio S, Skorinkin A, Talantova MV, Nistri A. Rapid relief of block by mecamlamine of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells in vitro: an electrophysiological and modeling study. *Mol Pharmacol*. 2000; **58**:778-787.
- Glassman AH, Helzer JE, Covey LS, Cottler LB, Stetner F, Tipp JE, Johnson J. Smoking, smoking cessation, and major depression. *JAMA*. 1990; **264**:1546-1549.
- Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*. 2004; **74**:363-396.
- Gumilar F, Arias HR, Spitzmaul G, Bouzat C. Molecular mechanisms of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology*. 2003; **45**:964-976.
- Hasey G, Hanin I. The cholinergic-adrenergic hypothesis of depression reexamined using clonidine, metoprolol, and physostigmine in an animal model. *Biol Psychiatry*. 1991; **29**:127-138.
- Hawkins JW. Antidepressant effects of nicotine. *J Clin Psychiatry*. 1997; **58**:324-325.
- Hennings EC, Kiss JP, De Oliveira K, Toth PT, Vizi ES. Nicotinic acetylcholine receptor antagonistic activity of monoamine uptake blockers in rat hippocampal slices. *J Neurochem*. 1999; **73**:1043-1050.
- Hennings EC, Kiss JP, Vizi ES. Nicotinic acetylcholine receptor antagonist effect of fluoxetine in rat hippocampal slices. *Brain Res*. 1997; **759**:292-294.
- Humble M. Noradrenaline and serotonin reuptake inhibition as clinical principles: a review of antidepressant efficacy. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 2000; **402**:28-36.
- Janowsky DS, el-Yousef MK, Davis JM, Sekerke HJ. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. *Lancet*. 1972; **2**:632-635.
- Karson CN, Newton JE, Livingston R, Jolly JB, Cooper TB, Sprigg J, Komoroski RA. Human brain fluoxetine concentrations. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1993; **5**:322-329.

- Katz B, Miledi R. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1965; **161**:496-503.
- Katz B, Miledi R. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J Physiol.* 1969; **203**:689-706.
- Katz B, Miledi R. The statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components. *J Physiol.* 1972; **224**:665-699.
- Katz B, Thesleff S. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol.* 1957; **138**:63-80.
- Khan I, Osaka H, Stanislaus S, Calvo RM, Deerinck T, Yaksh TL, Taylor P. Nicotinic acetylcholine receptor distribution in relation to spinal neurotransmission pathways. *J Comp Neurol.* 2003; **467**:44-59.
- Killen JD, Fortmann SP, Schatzberg A, Hayward C, Varady A. Onset of major depression during treatment for nicotine dependence. *Addict Behav.* 2003; **28**:461-470.
- Klimaschewski L, Reuss S, Spessert R, Lobron C, Wevers A, Heym C, Maelicke A, Schroder H. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in the rat superior cervical ganglion on mRNA and protein level. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994; **27**:167-173.
- Koelle GB. A proposed dual neurohumoral role of acetylcholine: its functions at the pre- and post-synaptic sites. *Nature.* 1961; **190**:208-211.
- Kubalek E, Ralston S, Lindstrom J, Unwin N. Location of subunits within the acetylcholine receptor by electron image analysis of tubular crystals from *Torpedo marmorata*. *J Cell Biol.* 1987; **105**:9-18.
- Kunh R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry.* 1958; **115**:459-464.
- Langer SZ. 25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; **18**:95-99.
- Leslie FM, Gallardo KA, Park MK. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated release of [3H]norepinephrine from developing and adult rat hippocampus: direct and indirect mechanisms. *Neuropharmacology.* 2002; **42**:653-661.

- Levin ED, Rezvani AH. Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2002; **1**: 423-431.
- Levin ED, Westman EC, Stein RM, Carnahan E, Sanchez M, Herman S, Behm FM, Rose JE. Nicotine skin patch treatment increases abstinence, decreases withdrawal symptoms, and attenuates rewarding effects of smoking. *J Clin Psychopharmacol.* 1994; **14**:41-49.
- Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. Células Nerviosas. Receptores a Neurotransmisores. En *Biología Celular y Molecular.* 4th ed; 2002: 946.
- López-Valdés H, García-Colunga J. Antagonism of nicotinic acetylcholine receptors by inhibitors of monoamine uptake. *Mol Psychiatry.* 2001; **6**:511-519.
- López-Valdés HE, García-Colunga J, Miledi R. Effects of clomipramine on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol.* 2002; **444**:13-19.
- Lukas RJ, Tubbs KA, Krivoshein AV, Bieber AL, Nelson RW. Mass spectrometry of nicotinic acetylcholine receptors and associated proteins as models for complex transmembrane proteins. *Anal Biochem.* 2002; **301**:175-188.
- Maggi L, Palma E, Miledi R, Eusebi F. Effects of fluoxetine on wild and mutant neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Mol Psychiatry.* 1998; **3**:350-355.
- Mandelzys A, Pie B, Deneris ES, Cooper E. The developmental increase in ACh current densities on rat sympathetic neurons correlates with changes in nicotinic ACh receptor alpha-subunit gene expression and occurs independent of innervation. *J Neurosci.* 1994; **14**:2357-2364.
- Markou A, Kosten TR, Koob GF. Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology.* 1998; **18**:135-174.
- Marks, M.J., Grady, S.R., Yang, J.M., Lippiello, P.M. and Collins, A.C.,. Desensitization of nicotine-stimulated $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from mouse brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 1994; **63**:2125–2135.
- Martin BR, Onaivi ES, Martin TJ. What is the nature of mecamylamine's antagonism of the central effects of nicotine? *Biochem Pharmacol.* 1989; **38**: 3391-3397.

- Mavissakalian MR, Perel JM. The side effects burden of extended imipramine treatment of panic disorder. *J Clin Psychopharmacol*. 2000; **20**:547-555.
- McCormick DA. Membrane Potential and Action Potential. En: *Fundamental Neuroscience*. Michael J. Zigmond, Bloom, Roberts and Squire. 1999; 129-154.
- McLean A, Rubinsztein JS, Robbins TW, Sahakian BJ. The effects of tyrosine depletion in normal healthy volunteers: implications for unipolar depression. *Psychopharmacology*. 2004; **171**:286-297.
- Mihailescu S, Drucker-Colin R. Nicotine, brain nicotinic receptors, and neuropsychiatric disorders. *Arch Med Res*. 2000; **31**:131-144.
- Mihailescu S, Palomero-Rivero M, Meade-Huerta P, Maza-Flores A, Drucker-Colin R. Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. *Eur J Pharmacol*. 1998; **369**:31-36.
- Milak MS, Parsey RV, Keilp J, Oquendo MA, Malone KM, Mann JJ. Neuroanatomic correlates of psychopathologic components of major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2005; **62**: 397-408.
- Newhouse P, Singh A, Potter A. Nicotine and nicotinic receptor involvement in neuropsychiatric disorders. *Curr Top Med Chem*. 2004; **4**:267-282.
- Nicholson GM, Blanche T, Mansfield K, Tran Y. Differential blockade of neuronal voltage-gated Na(+) and K(+) channels by antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol*. 2002; **452**:35-48.
- Nicolaidis S. Depression and neurosurgery: Past, present, and future. *Metabolism*. 2005; **54**: 28-32.
- Olale F, Gerzanich V, Kuryatov A, Wang F, Lindstrom J. Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human alpha3, alpha4, and alpha7 neuronal nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; **283**:675-683.
- O'Leary KT, Leslie FM. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptor-mediated [3H]norepinephrine release from rat cerebellum. *J Neurochem*. 2003; **84**:952-959.
- Olincy A, Young DA, Freedman R. Increased levels of the nicotine metabolite cotinine in schizophrenic smokers compared to other smokers. *Biol Psychiatry*. 1997; **42**:1-5.

- Papke RL, Sanberg PR, Shytle RD. Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; **297**: 646-656.
- Parker MJ, Beck A, Luetje CW. Neuronal nicotinic receptor beta2 and beta4 subunits confer large differences in agonist binding affinity. *Mol Pharmacol.* 1998; **54**:1132-1139.
- Paton WD. Sir Henry Dale (1875-1968). Some letters and papers. *Notes Queries.* 1976; **30**:231-248.
- Picciotto MR, Brunzell DH, Caldarone BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport.* 2002; **13**:1097-1106.
- Picciotto MR, Caldarone BJ, King SL, Zachariou V. Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2000; **22**:451-465.
- Picciotto MR. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; **24**:493-499.
- Popik P, Kozela E, Krawczyk M. Nicotine and nicotinic receptor antagonists potentiate the antidepressant-like effects of imipramine and citalopram. *Br J Pharmacol.* 2003; **139**:1196-1202.
- Quik M, Polonskaya Y, Gillespie A, Jakowec M, Lloyd GK, Langston JW. Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol.* 2000; **425**:58-69.
- Rao TS, Correa LD, Adams P, Santori EM, Sacaan AI. Pharmacological characterization of dopamine, norepinephrine and serotonin release in the rat prefrontal cortex by neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Brain Res.* 2003; **990**:203-208.
- Raskin A, Schulterbrandt JG, Reatig N, McKeon JJ. Differential response to chlorpromazine, imipramine, and placebo. A study of subgroups of hospitalized depressed patients. *Arch Gen Psychiatry.* 1970; **23**:164-173.
- Rose JE, Behm FM, Westman EC, Levin ED, Stein RM, Ripka GV. Mecamylamine combined with nicotine skin patch facilitates smoking cessation beyond nicotine patch treatment alone. *Clin Pharmacol Ther.* 1994; **56**:86-99.

- Rose JE, Behm FM, Westman EC. Nicotine-mecamylamine treatment for smoking cessation: the role of pre-cessation therapy. *Exp Clin Psychopharmacol.* 1998; **6**:331-343.
- Rush R, Kuryatov A, Nelson ME, Lindstrom J. First and second transmembrane segments of alpha3, alpha4, beta2, and beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunits influence the efficacy and potency of nicotine. *Mol Pharmacol.* 2002; **61**:1416-1422.
- Rust G, Burgunder JM, Lauterburg TE, Cachelin AB. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in the rat autonomic nervous system. *Eur J Neurosci.* 1994; **6**:478-485.
- Salin-Pascual RJ, Alcocer-Castillejos NV, Alejo-Galarza G. Nicotine dependence and psychiatric disorders. *Rev Invest Clin.* 2003; **55**:677-693.
- Sankararamkrishnan R, Adcock C, Sansom MS. The pore domain of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular modeling, pore dimensions, and electrostatics. *Biophys J.* 1996; **71**:1659-1671.
- Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci.* 1993; **13**:596-604.
- Sher E, Chen Y, Sharples TJ, Broad LM, Benedetti G, Zwart R, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, De Filippi G. Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr Top Med Chem.* 2004; **4**:283-297.
- Shytle RD, Silver AA, Lukas RJ, Newman MB, Sheehan DV, Sanberg PR. Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Mol Psychiatry.* 2002; **7**:525-535.
- Siegal, George J.; Agranoff, Bernard W.; Albers, R. Wayne; Fisher, Stephen K.; Uhler, Michael D. Intercellular Signaling. Acetylcholine. Nicotinic Receptors. En: *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular, and Medical Aspects.* 6th ed; 1999.
- Singer S, Rossi S, Verzosa S, Hashim A, Lonow R, Cooper T, Sershen H, Lajtha A. Nicotine-induced changes in neurotransmitter levels in brain areas associated with cognitive function. *Neurochem Res.* 2004; **29**:1779-1792.

- Srinivasan K, Ashok MV, Vaz M, Yeragani VK. Effect of imipramine on linear and nonlinear measures of heart rate variability in children. *Pediatr Cardiol.* 2004; **25**:20-25.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985; **85**:367-70.
- Stone CA, Torchiana ML, Navarro A and Beyer KH. Ganglionic blocking properties of 3-methylaminoisocamphane hydrochloride (mecamylamine): a secondary amine. *J Pharmacol.* 1956; **117**:169-183.
- Tennant FS Jr, Tarver AL. Withdrawal from nicotine dependence using mecamylamine: comparison of three-week and six-week dosage schedules. *NIDA Res Monogr.* 1984; **55**:291-297.
- Testai FD, Venera GD, Pena C, de Jimenez Bonino MJ. Histidine 186 of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit requires the presence of the 192-193 disulfide bridge to interact with alpha-bungarotoxin. *Neurochem Int.* 2000; **36**:27-33.
- Todorov L, Windisch K, Shersen H, Lajtha A, Papasova M, Vizi ES. Prejunctional nicotinic receptors involved in facilitation of stimulation-evoked noradrenaline release from the vas deferens of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1991; **102**:186-190.
- Tribollet E, Bertrand D, Marguerat A, Raggenbass M. Comparative distribution of nicotinic receptor subtypes during development, adulthood and aging: an autoradiographic study in the rat brain. *Neuroscience.* 2004; **124**:405-420.
- Unwin N. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* 2003; **555**:91-95.
- Unwin N. The nicotinic acetylcholine receptor of the Torpedo electric ray. *J Struct Biol.* 1998; **121**:181-190.
- Varanda WA, Aracava Y, Sherby SM, VanMeter WG, Eldefrawi ME, Albuquerque EX. The acetylcholine receptor of the neuromuscular junction recognizes mecamylamine as a noncompetitive antagonist. *Mol Pharmacol.* 1985; **28**:128-137.
- Wang F, Imoto K. Pore size and negative charge as structural determinants of permeability in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor channel. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1992; **250**:11-17.

- Waxhman MN. Neurotransmitter Receptors. En: *Fundamental Neuroscience*. Michael J. Zigmond, Bloom, Roberts y Squire. 1999; 235-367.
- Webster JC, Francis MM, Porter JK, Robinson G, Stokes C, Horenstein B, Papke RL. Antagonist activities of mecamlamine and nicotine show reciprocal dependence on beta subunit sequence in the second transmembrane domain. *Br J Pharmacol*. 1999; **127**:1337-1348.
- Westrin A, Nimeus A. The dexamethasone suppression test and CSF-5-HIAA in relation to suicidality and depression in suicide attempters. *Eur Psychiatry*. 2003; **18**: 66-71.
- Zarate CA Jr, Payne JL, Singh J, Quiroz JA, Luckenbaugh DA, Denicoff KD, Charney DS, Manji HK. Pramipexole for bipolar II depression: a placebo-controlled proof of concept study. *Biol Psychiatry*. 2004; **56**:54-60.
- Zhou X, Ren J, Brown E, Schneider D, Caraballo-Lopez Y, Galligan JJ. Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea pig small intestinal myenteric neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; **302**: 889-897.
- Zoli M, Le Novere N, Hill JA Jr, Changeux JP. Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J Neurosci*. 1995; **15**:1912-1939.
- Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C. Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci*. 2002; **22**:8785-8789.