



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

REGULACION DE RECEPTORES NICOTÍNICOS
NEURONALES POR ZINC

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

MARÍA ELIZABETH VÁZQUEZ GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA

JURIQUILLA, QUERÉTARO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Jesús García Colunga y la tutoría del Dr. Mauricio Díaz Muños y Stefan Mihailescu, contando con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM

Agradecimientos

A la universidad Nacional Autónoma de México.

A mi Tutor el Dr. José Jesús García Colunga, por todo su apoyo durante mi doctorado.

A los miembros de mi comité tutor: Mauricio Díaz Muñoz y Stefam Mihailescu por sus importantes aportaciones.

A mis sinodales: Dr. Froylán M. Gómez Lagunas, Dr. Marcia Hiriart Urdanivia, Dr. Michael Jeziorski, Dr. Carlos López Barajas, por sus valiosos comentarios.

A la Química Leonor Casanova Rico y Carmelita Vázquez de posgrado, por importante ayuda que siempre me brindaron.

A M.V.Z. Martín García, por su importante apoyo e interés en el cuidado de las ranas.

A los diversos servicios de apoyo del Instituto de Neurobiología, Lic. Lourdes Lara, Lic. Rafael Silva Cruz.

A los miembros de Laboratorio: Miriam, Mónica, Olivia, Bere, Reinaldo y Marcelino.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	8
1. Los receptores nicotínicos	8
1.1 Estructura los receptores nicotínicos	8
1.2. Distribución de los receptores nicotínicos	14
1.3. Propiedades funcionales de los receptores nicotínicos	17
1.3.1. Estados funcionales de los receptores nicotínicos	18
1.3.2. Permeabilidad a calcio de los receptores nicotínicos	18
1.3.3. Desensibilización de los receptores nicotínicos	19
1.4. Fisiología y patologías relacionadas con los receptores nicotínicos	21
2. la nicotina	24
3. El zinc	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	31
Objetivo general	31
Objetivos particulares	31

MATERIALES Y MÉTODOS	32
Transformación de bacterias	32
Multiplicación del plásmido	33
Purificación de DNA	33
Linearización con enzimas de restricción	34
Purificación del DNA con fenol-cloroformo	35
Transcripción <i>in vitro</i>	36
Disección de la rana y microinyección de los ovocitos	37
Registro electrofisiológico	38
Drogas	39
Análisis de resultados	39
Estadística	40
RESULTADOS	41
Potenciación por zinc de la corriente generada con acetilcolina o nicotina	43
Efectos de zinc en función de la concentración de nicotina	45
Diferentes grados de desensibilización	53
Efectos de zinc en receptores nicotínicos expuestos a diferentes tiempos de nicotina	56
Efectos de zinc durante tiempos prolongados de nicotina	63
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la subunidad α del receptor nicotínico	10
Figura 2. El receptor nicotínico	12
Figura 3. Efectos de zinc y nicotina en ovocitos control	42
Figura 4. Efecto de zinc sobre la corriente activada con acetilcolina y con nicotina	45
Figura 5. Efecto de zinc en función de la concentración de nicotina	47
Figura 6. Efectos de zinc dependientes de la concentración de nicotina	50
Figura 7. Efecto del zinc en función de la concentración de nicotina	52
Figura 8. Diferentes grados de desensibilización	55
Figura 9. Efectos de zinc expuestos a diferentes tiempos de nicotina	58
Figura 10. Efectos de zinc expuestos a diferentes tiempos de nicotina	60
Figura 11. Efectos de zinc a diferentes tiempos de aplicación de nicotina	62
Figura 12. Efectos de zinc durante tiempos prolongados de aplicación de nicotina	64
Figura 13. Efectos de zinc en función del tiempo de exposición a nicotina	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución y localización de receptores nicotínicos	16
---	----

APÉNDICE

Artículo publicado	90
--------------------	----

RESUMEN

Se sabe que el zinc modula los receptores de acetilcolina nicotínicos. En este trabajo se evaluaron los efectos que ejerce el zinc en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* y activados con nicotina. La corriente iónica activada con nicotina (10 nM a 100 μ M) aumentó con zinc (100 μ M). La potenciación máxima por zinc (2530% con respecto al control) se obtuvo con 50 nM de nicotina, y la potenciación disminuyó gradualmente al aumentar la concentración de nicotina. La EC_{50} y la IC_{50} para la corriente activada con nicotina fueron de 639 nM y 14.7 μ M, respectivamente. Ambos parámetros disminuyeron con zinc, 160 nM y 4.6 μ M, respectivamente, probablemente debido al incremento de la sensibilidad de los receptores nicotínicos por la nicotina. Aplicamos diferentes concentraciones y tiempos de exposición de nicotina, debido a que la desensibilización de los receptores nicotínicos depende directamente de estos factores. Así, con 500 nM de nicotina y 20 min de lavado entre las aplicaciones de nicotina, la potenciación por zinc se mantuvo constante, 901% para 2 min y 813% para 20 min de exposición de nicotina. En contraste, con la aplicación continua de nicotina, la potenciación por zinc disminuyó al aumentar el tiempo de exposición de nicotina, 721% para 2 min y 254% para 48 min de exposición de nicotina. Nuestros resultados indican que los efectos de potenciación por zinc de los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ dependen de la concentración y del tiempo de exposición de nicotina, sugiriendo que los efectos del zinc dependen del grado de desensibilización de los receptores nicotínicos y que el zinc hace más sensible a los receptores nicotínicos por la nicotina.

ABSTRACT

It is known that zinc modulates nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Here, we studied the effects of zinc on neuronal $\alpha 4\beta 4$ nAChRs, expressed in *Xenopus* oocytes and activated by nicotine. Membrane ion currents elicited by nicotine (10 nM to 100 μ M) were enhanced by zinc (100 μ M). Maximal zinc potentiation of the nicotine-activated current (2530%) occurred at 50 nM nicotine, and potentiation gradually decreased as the nicotine concentration increased. The EC_{50} and IC_{50} for the nicotine-activated current were 639 nM and 14.7 μ M nicotine, respectively. Both parameters decreased in the presence of zinc to 160 nM and 4.6 μ M, respectively, probably due to an increase of sensitivity of nAChRs for nicotine. We used different concentrations and durations of exposure to nicotine, because desensitization of nAChRs directly depends on both these factors. With 500 nM nicotine and 20 min washing periods between nicotine applications, zinc potentiation remained constant, 901% for 2 min and 813% for 20 min of nicotine exposure. With continuous application of nicotine, zinc potentiation decreased as the time of nicotine exposure increased, 721% for 2 min and 254% for 48 min of nicotine exposure. Our results indicate that the zinc-potentiating effects on $\alpha 4\beta 4$ nAChRs strongly depend on both concentration and time of exposure to nicotine, suggesting that zinc potentiation depends on the degree of desensitization.

INTRODUCCIÓN

Los receptores de acetilcolina nicotínicos son proteínas pentaméricas compuestas de diferentes subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$). Los receptores nicotínicos se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro y su función principal es modular la liberación de distintos neurotransmisores como serotonina, dopamina, norepinefrina, glutamato, ácido γ -aminobutírico y acetilcolina (Dani y Bertrand, 2007; Lendvai y Vizi, 2008).

Por otro lado, el catión divalente zinc se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso y es liberado por algunas terminales nerviosas glutamatérgicas alcanzando concentraciones de 7-300 μ M (Frederickson et al., 2006; Paoletti et al., 2009). El zinc interactúa con diversas proteínas de membrana que incluyen receptores a neurotransmisores, canales iónicos y transportadores a neurotransmisores, actuando como un modulador endógeno en el sistema nervioso central (Frederickson et al., 2005; Harrison y Gibbons, 1994).

Por ejemplo, el zinc potencia e inhibe la respuesta generada por acetilcolina de la mayoría de los receptores nicotínicos, dependiendo de la concentración de zinc y de la composición de la subunidades del receptor (García-Colunga et al., 2001; Hsiao et al., 2001; Moroni et al., 2008; Palma et al., 1998). En particular, los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ muestran la mayor potenciación por zinc (Hsiao et al., 2001).

De manera interesante, la nicotina (sustancia responsable de la adicción al tabaco), el zinc (liberado de algunas terminales glutamatérgicas) y los receptores nicotínicos neuronales (ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central)

participan en funciones comunes como el desarrollo del cerebro, el aprendizaje, la memoria, y en patologías como epilepsia, esquizofrenia, ansiedad, adicción, depresión y las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer (Gotti et al., 2006; Jensen et al., 2005; Levin et al., 2006; Mocchegiani et al., 2005; Zhang et al., 2006).

El objetivo del presente trabajo fue investigar los efectos del zinc sobre los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ cuando éstos fueron activados con nicotina. Para ello los receptores fueron expresados en ovocitos de *Xenopus*, la corriente iónica se activó con nicotina y se registró utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. Estos estudios podrían ayudar a entender la interacción del zinc y la nicotina con los receptores de acetilcolina nicotínicos neuronales y su posible contribución en las funciones y patologías en las que participan.

ANTECEDENTES

1. Los receptores nicotínicos

Los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico son canales catiónicos activados por ligando, también llamados receptores ionotrópicos, que pertenecen a la misma superfamilia génica de los receptores tipo A y C de ácido γ -aminobutírico (GABA), receptores tipo 3 de 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) y receptores de glicina (Le Novère et al., 2002). Los receptores nicotínicos se dividen en musculares y neuronales. Los receptores nicotínicos musculares están compuestos por las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ y δ ; mientras que los receptores nicotínicos neuronales están compuestos por la combinación de distintas subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$), las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro (Dani y Bertrand, 2007; Jensen et al., 2005). La transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso periférico está mediada por receptores nicotínicos; mientras que en el sistema nervioso central los receptores nicotínicos son predominantemente presinápticos e influyen en la liberación de neurotransmisores como serotonina, glutamato, GABA, norepinefrina, acetilcolina y dopamina (Dani y Bertrand, 2007; Lendvai y Vizi, 2008).

1.1 Estructura los receptores nicotínicos

Estructuralmente, todos los miembros de la superfamilia de receptores ionotrópicos con asa de cisternas (Cys-loop) comparten las mismas características: **a)** cada receptor es un oligómero compuesto por cinco

subunidades; **b)** cada subunidad atraviesa la membrana lipídica formando cuatro regiones transmembranales, de la TM1 a la TM4; **c)** los amino ácidos de la región TM2 de cada subunidad al parecer forman la pared del canal iónico; **d)** los dominios intracelulares están formados por un asa relativamente grande entre TM3 y TM4, y un asa corta entre TM1 y TM2; **e)** los dominios extracelulares incluyen las terminales carboxilo y amino. En la terminal amino de la subunidad α se ubican los sitios de unión al agonista. Los dominios TM2-TM3 están unidos por una asa extracelular corta (Fig. 1; Albuquerque et al., 2009; Arias, 1998; Collingridge et al., 2009; Corringer et al., 2000; Feldman et al., 1999).

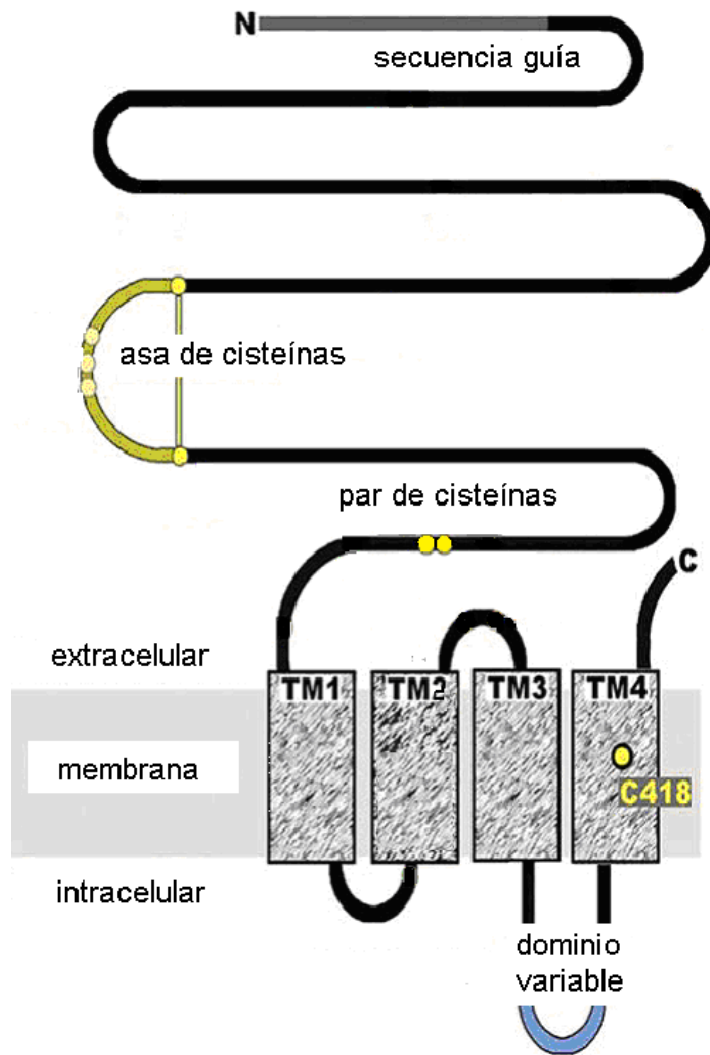


Figura 1. Estructura de la subunidad α del receptor nicotínico. Secuencia básica lineal de una subunidad del receptor nicotínico, el dominio extracelular contiene las terminales carboxilo y amino. En esta última se encuentran dos residuos de cisteína adyacentes separadas por 13 aminoácidos en cada subunidad α , los cuales forman un enlace disulfuro que parece contribuir con los sitios de unión para la acetilcolina (modificada de Albuquerque et al., 2009).

Los receptores nicotínicos musculares y neuronales tienen una estructura pentamérica (Fig. 2). Los receptores nicotínicos musculares se localizan en el tejido muscular de aves y mamíferos, así como en los órganos eléctricos de las rayas y las anguilas eléctricas. Estos receptores se ensamblan con una estequiometría $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ (Unwin, 2005). La subunidad γ se expresa en los receptores embrionarios y en la etapa adulta esta subunidad es sustituida por la ε (Le Novère et al., 2002; Unwin, 2005). Los sitios de unión para la acetilcolina, en los receptores nicotínicos musculares, se encuentran entre las interfases α - δ y α - γ/ε (Celie et al., 2004; Corringer et al., 2000; Sine, 2002).

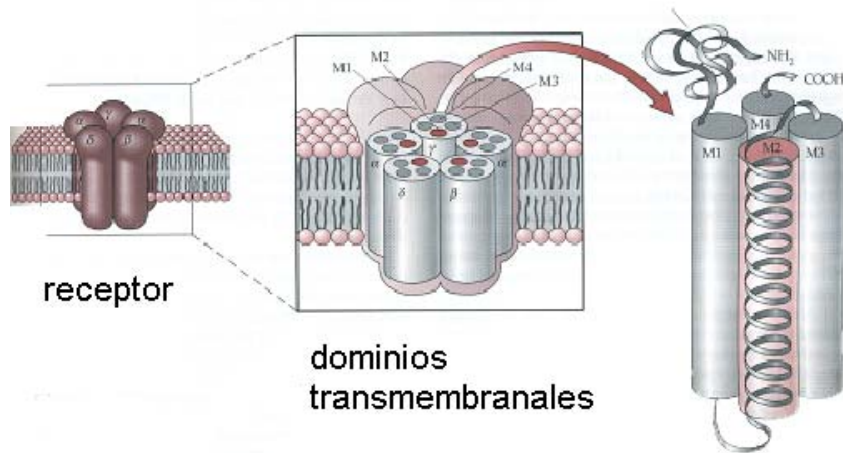


Figura 2. El receptor nicotínico. El esquema representa un receptor nicotínico. Está formado por cinco subunidades, cada una atraviesa la membrana lipídica, y tiene cuatro regiones transmembranales denominadas M1-M4 (modificada de Feldman et al., 1999).

Por otro lado, los receptores nicotínicos neuronales también están constituidos por cinco subunidades. La estequiometría más frecuente en los receptores nicotínicos neuronales heterómeros es de $(\alpha)_2(\beta)_3$, mientras que la de los homómeros es de $(\alpha)_5$. Actualmente se conocen 12 subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$) que codifican para estos receptores y que forman varios subtipos de receptores, producto de la combinación de subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 6$) con β ($\beta 2$ - $\beta 4$) o bien, formados sólo por cinco subunidades α idénticas ($\alpha 7$ - $\alpha 9$), la subunidad $\alpha 10$ forma un heterómero con $\alpha 9$, y la subunidad $\alpha 8$ sólo se ha encontrado en aves (Changeux y Edelstein, 2001; Dani y Bertrand, 2007; Paterson y Nordberg, 2000). Para los receptores nicotínicos neuronales el sitio de unión para acetilcolina se encuentra entre las interfases formadas por la subunidades α 's y β 's en los receptores heterómeros, mientras que en los homómeros se encuentran entre las interfases formadas por las subunidades α 's. (Karlin, 2002; Sine, 2002).

En cuanto a las dimensiones del poro que forma el canal por donde fluyen los cationes cuando el receptor nicotínico se encuentra en el estado funcional abierto, éstas se determinaron estudiando la permeabilidad a diferentes cationes orgánicos de dimensiones conocidas. Así, la parte más estrecha del canal tiene un diámetro aproximado de 7 Å y constituye el filtro de selectividad (Unwin, 2005; Villarroel y Sakmann, 1996). En estas condiciones, permite el paso de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} parcialmente hidratados (Fusile, 2004; Villarroel y Sakmann, 1996).

1.2. Distribución de los receptores nicotínicos

Los receptores nicotínicos se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso. La distribución de las distintas subunidades varía en las diferentes áreas del cerebro, predominando las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ (Quirk et al., 2000). Por ejemplo, los receptores nicotínicos $\alpha 7$ se expresan particularmente en la corteza, en regiones límbicas subcorticales y más ampliamente se encuentra en regiones somatodendríticas de interneuronas del hipocampo, realizando funciones tanto sinápticas como no-sinápticas. Así, cuando hay activación sináptica por la liberación de acetilcolina, los receptores nicotínicos $\alpha 7$ somatodendríticos inducen una despolarización de corta duración de las interneuronas con una magnitud suficiente para generar un potencial de acción y transmitir inhibición o desinhibición a las neuronas piramidales (Freund y Buzsaki, 1996). En regiones talámicas y ganglionares los niveles de los receptores $\alpha 7$ se encuentran más bajos (Levin, 2002).

Los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, al parecer, son los más abundantes en el sistema nervioso central, además de ser los más estudiados debido a su alta afinidad a la nicotina y su posible relación con la adicción a ésta (Dani y Bertrand, 2007). Este receptor se encuentra de manera muy abundante en la corteza cerebral, el estriado, el colículo superior, en el núcleo geniculus lateralis y cerebelo (Gotti et al., 2005; Turner y Kellar, 2005; Zoli et al., 2002). En el estriado y la corteza, una subpoblación de este subtipo contiene la subunidad $\alpha 5$. En el estriado, el subtipo $\alpha 4\beta 2$ está presente en neuronas dopaminérgicas y núcleos catecolaminérgicos, además el subtipo $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ está específicamente expresado

en terminales dopaminérgicas (Alkondon y Albuquerque, 2005; Zoli et al., 2002). En humanos, durante el desarrollo temprano, se incrementan los niveles de RNAm de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ en la corteza cerebral, la formación hipocampal y el cordón espinal (Alkondon y Albuquerque, 2005).

La habénula media y el hipocampo de rata expresan transcritos de varias subunidades ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$), y muy abundantemente la $\beta 4$ (Albuquerque et al., 2000; Alkondon y Albuquerque, 2004), mientras que el subtipo de receptores nicotínicos $\alpha 3\beta 4$ en el cerebro de macaca mulata se encuentra ampliamente distribuido en la médula adrenal y en subconjuntos de terminales nerviosas de la habénula media, núcleo interpeduncular, médula espinal dorsal, glándula pineal y retina (Han et al., 2000). En el mono se detectó alta expresión del RNAm de la subunidad $\alpha 4$ en el cerebelo, las regiones CA2 y CA3 del hipocampo y giro dentado; menor expresión en la región CA1 del hipocampo, putamen, núcleo genículo lateral, núcleo subtalámico y sustancia nigra; y baja expresión en el núcleo caudado, área ventral tegmental, tálamo y locus coeruleus. Asimismo el RNAm de la subunidad $\beta 4$ también se encuentra ampliamente distribuido en todo el hipocampo, la neocorteza, el riencéfalo, los ganglios basales, el diencéfalo y el cerebelo. Así, las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$ son las que más se expresan en el sistema nervioso central y la localización de las subunidades $\alpha 6$ y $\beta 3$ están más restringidas (Quik et al., 2000). Con relación a las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 4$ en cerebro de rata, éstas se encuentran localizadas en la habénula media, el cerebelo, el hipocampo y la retina (Sudweeks y Yakel, 2000; Turner y Kellar, 2005), por lo que

podrían estar participando en procesos como memoria, aprendizaje y visión, entre otras.

En la tabla 1 se muestran algunos de los subtipos de receptores nicotínicos que se han identificado en vertebrados.

Tabla 1. Distribución y localización de receptores nicotínicos.

Subtipo	Especie	Localización
$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$	Bovino	Músculo
$\alpha 1\beta 1\gamma\epsilon$	Bovino	Músculo
$\alpha 2\alpha 4\beta 2$	Pollo	Retina
	Roedor	Retina
	Mono	Corteza
$\alpha 2\alpha 5\beta 2$	Pollo	Lóbulo óptico
$\alpha 2\beta 2$	Pollo	Retina
	Roedor	Retina, Núcleo interpeduncular
$\alpha 2\beta 4$	Pollo	Retina
	Roedor	Retina
$\alpha 3\alpha 4\beta 2$	Mono	Corteza
$\alpha 3\alpha 4\alpha 6\beta 2$	Roedor	Nervio óptico
$\alpha 3\alpha 5\beta 2$	Roedor	Culículo superior
	Humano	Células SH-SY5Y
$\alpha 3\alpha 5\beta 2\beta 4$	Pollo	Ganglio ciliar
$\alpha 3\alpha 5\beta 4$	Pollo	Ganglio ciliar
	Roedor	Ganglio cervical superior, Cerebelo
$\alpha 3\alpha 6\beta 2$	Pollo	Retina
	Roedor	Retina, nervio óptico
$\alpha 3\beta 2$	Roedor	Retina, nervio óptico
	Mono	Estriado
$\alpha 3\beta 2\beta 3$	Roedor	Colículo superior
$\alpha 3\beta 2\beta 4$	Roedor	Retina, Cerebelo, Ganglio cervical superior
$\alpha 3\beta 3\beta 4$	Roedor	Habénula, núcleo interpeduncular
$\alpha 3\beta 4$	Roedor	Glándula pineal, cerebelo
$\alpha 3\beta 4$	Roedor	Habénula media
$\alpha 4\alpha 5\beta 2$	Pollo	Cerebro
	Roedor	Estriado, colículo superior y núcleo

		geniculado lateral
$\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$	Roedor	Colículo superior, núcleo geniculado lateral, nervio óptico, Retina y estriado
	Mono	Estriado
$\alpha 4\beta 2$	Pollo	Cerebro
	Roedor	Cerebro
	Bovino	Cerebro
$\alpha 4\beta 2$	Roedor	Médula espinal
$\alpha 4\beta 4$	Pollo	Retina
$\alpha 4\beta 4$	Roedor	Retina
$\alpha 6\beta 2$	Roedor	Retina
$\alpha 6\beta 2$	Roedor	Estriado
$\alpha 6\beta 2\beta 3$	Roedor	Retina, colículo superior, núcleo geniculado lateral, estriado
	Mono	Estriado
$\alpha 6\beta 2\beta 3$	Pollo	Retina
	Humano	Estriado
$\alpha 6\beta 3\beta 4$	Pollo	Retina
$\alpha 6\beta 4$	Pollo	Retina
$\alpha 7$	Pollo	Retina, lóbulo óptico
	Roedor	Cerebro
	Humano	Células IMR-32
$\alpha 7\alpha 8$	Pollo	Retina, lóbulo óptico
$\alpha 8$	pollo	Retina
$\alpha 9\alpha 10$	Roedor	Coclea

Modificada de Millar y Gotti, 2009.

1.3. Propiedades funcionales de los receptores nicotínicos

Los receptores nicotínicos participan en una amplia variedad de funciones y patologías, las cuales están íntimamente relacionadas con las diferentes propiedades funcionales de los receptores nicotínicos. Así, los subtipos de receptores nicotínicos se caracterizan por las propiedades que presentan ante la unión del agonista (activación del receptor), la unión de un ligando farmacológico,

la cinética de desensibilización y la permeabilidad catiónica (Fenster et al., 1997; Paradiso y Steinbach, 2003).

1.3.1. Estados funcionales de los receptores nicotínicos

Una de las principales acciones fisiológicas del agonista endógeno (acetilcolina) sobre los receptores nicotínicos es desencadenada por la interacción de estas moléculas con los sitios de unión en el receptor. En ausencia del agonista el receptor nicotínico permanece en estado de reposo o cerrado y al unirse la acetilcolina, el receptor nicotínico experimenta cambios conformacionales que conducen a tres estados funcionales: **(1)** un estado activo, que ocurre cuando las moléculas de acetilcolina se unen a sus respectivos sitios de unión y la probabilidad de apertura del canal es alta, estabilizando al receptor en un estado abierto **(2)** y **(3)** dos estados desensibilizados denominados (inicial) y (tardío), que predominan después de la exposición del agonista por varios cientos de milisegundos, en los que el canal no conduce iones (Paterson y Nordberg, 2000; Zouridakis et al., 2009).

1.3.2. Permeabilidad a calcio de los receptores nicotínicos

El Ca^{2+} intracelular participa en diversos procesos fisiológicos, como la liberación de neurotransmisores, la transcripción génica, neuroprotección y plasticidad sináptica, entre otros (Berridge et al., 2003; Ji et al., 2001; Kihara et al., 1997; Shen y Yakel, 2009), así como en procesos patológicos y desórdenes neurodegenerativos (Weiss et al., 2000). Los receptores nicotínicos son permeables a Ca^{2+} , de esta manera modulan la liberación de neurotransmisores

en las terminales presinápticas cuando aumenta la concentración de calcio intracelular (Vizi y Lendvai, 1999).

Está bien documentado que los receptores nicotínicos son permeables a K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , propiedad que también depende de la combinación de las subunidades que forman el receptor. Por ejemplo, los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 7$ son los de mayor permeabilidad a Ca^{2+} , con una permeabilidad relativa de Ca^{2+} con respecto a Na^+ , P_{Ca}/P_{Na} , de ~ 20 (Fusile, 2004; Seguela et al., 1993), lo cual tiene importantes implicaciones durante el desarrollo y en la plasticidad sináptica (Broide y Leslie, 1999). Los receptores nicotínicos con subunidades α y β tienen menor permeabilidad a Ca^{2+} que los $\alpha 7$. Así, los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ de pollo tienen una permeabilidad relativa P_{Ca}/P_{Na} de 1.65 (Haghighi y Cooper, 2000). Finalmente, los receptores nicotínicos musculares de embriones ($\alpha 1\beta 1\delta\gamma$) tienen una permeabilidad relativa P_{Ca}/P_{Na} de 0.16 – 0.2, con una fracción de la corriente de Ca^{2+} de $\sim 2\%$ (Cens et al., 1997; Costa et al., 1994), mientras que la P_{Ca}/P_{Na} de los receptores nicotínicos musculares de adulto ($\alpha\beta\delta\varepsilon$) es de 0.45 – 1.38, con una fracción de la corriente de Ca^{2+} de $\sim 4\%$ (Cens et al., 1997; Fusile et al., 2000; Gómez et al., 2002; Ragozzino et al., 1998).

1.3.3. Desensibilización de los receptores nicotínicos

Otra función de los receptores nicotínicos es la desensibilización, que al igual que la permeabilidad, depende del agonista con el que se activa al receptor, de la concentración del agonista y de las subunidades que conforman al receptor.

Una exposición prolongada del agonista, o bien una concentración alta hace que los receptores nicotínicos sean refractarios al estímulo, y en consecuencia haya una disminución o pérdida de la respuesta celular. Este proceso, llamado desensibilización, ocurre porque el receptor nicotínico unido con su agonista adopta una conformación estable en la que no puede conducir iones (Karlin, 2002; Revah et al., 1991). En el cerebro, la desensibilización podría ocurrir como resultado de una exposición prolongada de nicotina (como en los fumadores), o debido al tratamiento con inhibidores de la acetilcolinesterasa (utilizados principalmente en la enfermedad de Alzheimer) que impiden la degradación de la acetilcolina (Wang y Sun, 2005).

Hasta el momento, el mecanismo de desensibilización no se ha comprendido totalmente. Algunos autores señalan que este proceso se acelera por la fosforilación del receptor, a través de la proteína cinasa C o la proteína cinasa A dependiente de AMP cíclico, las cuales se activan con la entrada de Ca^{2+} . En los receptores nicotínicos musculares el posible sitio de fosforilación es la serina 377 de la subunidad δ , que al sustituirse por alanina afecta la desensibilización (Nishizaki y Sumikawa, 1998). Mientras que en los receptores nicotínicos neuronales la subunidad β juega un papel importante en la cinética de desensibilización, ya que quimeras de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ muestran que la región extracelular amino-terminal controla la cinética de desensibilización (Bohler et al., 2001).

En resumen, la desensibilización depende de varios factores: del agonista (la nicotina desensibiliza más que la acetilcolina a los receptores nicotínicos

neuronales), de la concentración del agonista, del tiempo de exposición del agonista, de la fosforilación del receptor y de las subunidades que componen al receptor (Buccafusco et al., 2009; Fenster et al., 1997; Paradiso y Steinbach 2003).

1.4. Fisiología y patologías relacionadas con los receptores nicotínicos

Tanto los receptores nicotínicos musculares como los neuronales contribuyen a una amplia variedad de procesos, tanto funcionales como patológicos. Por su gran diversidad, se piensa que los receptores nicotínicos participan en diversos desórdenes, tanto adquiridos como heredados. Por ejemplo, en la Miastenia gravis los receptores nicotínicos musculares se ven afectados por autoanticuerpos que alteran la transmisión neuromuscular, resultando en una debilidad de músculos craneales y esqueléticos. Los anticuerpos dirigidos contra los receptores de acetilcolina dañan la unión neuromuscular, impidiendo la transmisión de los impulsos hacia los músculos esqueléticos (Vincent et al., 2004).

Los receptores nicotínicos neuronales también influyen en un gran número de funciones fisiológicas, como procesos cognitivos, aprendizaje, atención, memoria, excitación sexual, percepción sensorial. Además, la perturbación de la neurotransmisión colinérgica nicotínica conduce a varios desórdenes relacionados con patologías como esquizofrenia, las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, y desórdenes mentales como la depresión (Clementi et al., 2000; López-Valdés y García-Colunga 2003; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000; Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto, 2003).

Enfermedad de Alzheimer. Es la causa más común de demencia senil, caracterizada por una disminución progresiva de las funciones cognitivas, que particularmente afectan la memoria, atención y orientación. La mayoría de las estrategias que se siguen para abordar este desorden están basadas en la hipótesis colinérgica desarrollada hace más de 20 años, que sugiere que una disfunción de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior rostral y basal así como del tálamo contribuyen de manera considerable al decline cognitivo (Bartus, 2000; Terry y Buccafusco, 2003).

Esquizofrenia. Es un desorden neuropsiquiátrico que afecta al 1% de la población, se caracteriza por un pensamiento fragmentado, alucinaciones, delirios, además de cambios en el humor y desórdenes afectivos. No se conocen aun las causas moleculares de la esquizofrenia. Sin embargo, se han desarrollado varias hipótesis, entre ellas la hipótesis colinérgica, que supone una deficiencia en la transmisión colinérgica. Con relación a ésta, se ha reportado una disminución en la expresión de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ en la corteza cerebral, así como la disminución en la afinidad a nicotina en estudios post mortem de pacientes con esquizofrenia (Burghaus et al., 2000; Guan et al., 2000; Martín-Ruiz et al., 1999).

Enfermedad de Parkinson. Este desorden, en el que ocurre una fuerte degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal y un aumento de los cuerpos de Lewis intracelulares (Lang y Obeso, 2004; Samii y Nutt, 2004), se caracteriza por un déficit en la actividad motora, incluyendo rigidez, temblor y

bradiquinesia. En la enfermedad de Parkinson los receptores nicotínicos se encuentran disminuidos en pacientes con Parkinson y que son fumadores, o que están sometidos a tratamientos con agonistas nicotínicos, las perturbaciones motoras se reducen, aunque sólo por periodos cortos (Ishikawa y Miyatake, 1993). En monos con daño nigroestriatal se observó una disminución de los receptores nicotínicos $\alpha6\beta2$, acompañado de una reducción en los transportadores de dopamina (Quik et al., 2001). Todos estos estudios indican que los receptores nicotínicos tienen un papel importante en la enfermedad de Parkinson.

Depresión. Este es un trastorno emocional que altera principalmente el estado afectivo, provocando tristeza, decaimiento del estado de ánimo, irritabilidad, además también puede perturbar el sueño, el apetito y los niveles de energía por tiempos prolongados (Frances et al., 1999). Las causas moleculares de la depresión no están del todo claras. Se han propuesto diversas hipótesis enfocadas al sistema monoaminérgico, principalmente debido a una disminución de dopamina y serotonina, de ahí que muchos de los medicamentos que se utilizan están diseñados para actuar principalmente sobre los transportadores de monoaminas (Borodavka, 1989). Otra hipótesis propone al sistema colinérgico, que sugiere que un aumento de la transmisión mediada por acetilcolina contribuye a la depresión (Hasey y Hanin, 1991). Además, existen varios estudios donde se muestra que sustancias que se utilizan para el tratamiento de la depresión inhiben a los receptores nicotínicos neuronales. Los primeros estudios al respecto fueron reportados por Aronstam (1981), donde se observó que la imipramina,

desipramina, amitriptilina y nortriptilina inhiben a los receptores nicotínicos. Posteriormente, otros estudios han mostrado que antidepresivos de distintos tipos y diferente estructura química también inhiben a los receptores nicotínicos (Caldarone et al., 2004; Fryer y Lukas 1999; García-Colunga et al., 1997; López-Valdés et al., 2001; Rana et al., 1993). Otras sustancias de relevancia en los tratamientos para la depresión son la nicotina y el zinc (Fergusson et al., 2003; Levenson, 2006; Salín-Pascual y Drucker-Colín 1998; Vázquez-Palacios 2004)

2. La nicotina

La nicotina es el principal componente adictivo del tabaco, ésta se absorbe con facilidad en las vías respiratorias, pasa a los pulmones, circulando por venas pulmonares, y llega rápidamente al cerebro cruzando la barrera hematoencefálica. Inmediatamente después de fumar un cigarro, la nicotina alcanza una concentración de ~300 nM tanto en la sangre arterial como en el cerebro, que decae en los siguientes 20-30 min. Interesantemente, la nicotina absorbida a partir de un cigarro llega casi inmediatamente al sistema nervioso por lo que sus efectos se alcanzan en pocos segundos (Benowitz, 2008; Le Houezec, 2003). Así, en el sistema nervioso central la nicotina interactúa con los receptores nicotínicos, en los mismos sitios que la acetilcolina, modificando la función de numerosos sistemas de neurotransmisión, incluyendo los de la noradrenalina, la 5-hidroxitriptamina, el glutamato, el GABA y de péptidos opioides (Dani y De Biasi, 2001; Picciotto, 2003).

Por lo anterior, se sabe que la nicotina modifica una amplia variedad de funciones asociadas con la memoria y el aprendizaje, y con patologías como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, esquizofrenia, ansiedad, adicción y depresión, entre otras (Gotti et al., 2006; Jensen et al., 2005; Kumari y Postma, 2005; Levin et al., 2006).

Aun cuando la nicotina tiene efectos severos en la adicción, también se le ha atribuido efectos favorables sobre el estado de ánimo, la excitación y la concentración para realizar ciertas tareas (Hawkins, 1997; Markou, 2008; Salín-Pascual et al., 2003). Estos efectos se pierden cuando una persona deja de fumar, debido a la aparición de los síntomas de abstinencia de nicotina, apareciendo síntomas como irritabilidad, humor depresivo, ansiedad, dificultad en la concentración, insomnio entre otras (Hughes, 1986).

La nicotina es un agonista específico de los receptores nicotínicos, de ahí su nombre. La afinidad de la nicotina por los receptores nicotínicos depende de las subunidades que componen al receptor. Por ejemplo, la subunidad β juega un papel muy importante para determinar la sensibilidad de los agonistas (Luetje y Patrick, 1991). Así, la concentración con la que se activa el 50% de la respuesta máxima, EC_{50} , es de 12, 65, 14 y 90 μM para los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 7$, respectivamente (Fenster et al., 1997; Paradiso y Steinbach, 2003). También, cabe destacar que la mayoría de los receptores nicotínicos neuronales son más sensibles a la nicotina que a la acetilcolina. Así, la concentración a la que se alcanza el 50% de la corriente máxima (EC_{50}) para los

receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ es 5-11 μM de nicotina y 19-74 μM de acetilcolina (Chavez–Noriega et al., 1997; Fenster et al., 1997; Hsiao et al., 2001; 2006).

En la adicción a la nicotina, los receptores nicotínicos juegan un papel muy importante, sugiriendo que el subtipo $\alpha 4\beta 2$ está fuertemente relacionado con los efectos de gratificación al aumentar los niveles de dopamina en el núcleo acumbens (Corrigall y Coen, 1994; Placzek et al., 2009) Estudios realizados *in vitro*, con animales crónicamente tratados con nicotina y en cerebros de humanos fumadores, se ha mostrado que el subtipo de receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ es el que más se incrementa en áreas como hipocampo, estriado, corteza cerebral, tálamo (Mao et al., 2008; Nguyen et al., 2003; Picciotto et al., 2008). Sin embargo, cuando este subtipo además contiene la subunidad $\alpha 3$ ($\alpha 3\alpha 4\beta 2$), la administración crónica de nicotina no incrementa el número de receptores en estas áreas (Mao et al., 2008). Se desconoce si la subunidad $\alpha 3$ protege al organismo de la adicción, al no permitir un aumento en el número de receptores nicotínicos. Otras subunidades de receptores nicotínicos que participan en el control de la liberación de dopamina inducida por nicotina son las $\alpha 6$, $\alpha 7$ y $\beta 3$. Por ejemplo, en ratas “knockout” sin la subunidad $\beta 2$, la nicotina activa neuronas del cerebro medio, mediante la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$, que se expresan en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (Champtiaux et al., 2003).

3. zinc

El zinc es un ión fundamental en las células. Actúa como cofactor en cientos de enzimas, además de estabilizar la estructura del DNA, RNA y los

ribosomas (MacDonald, 2000; Vallee y Falchuk, 1993). En este sentido, el zinc es capaz de regular numerosos procesos del organismo, incluyendo la síntesis de DNA, el desarrollo del cerebro, la apoptosis, la proliferación celular, el estrés oxidativo, entre otros (Barceloux, 1999; Cousins et al., 2006; Oteiza y Mackenzie 2005).

El zinc se encuentra ampliamente distribuido en el organismo (cerebro, cuerpo y huesos). Por ejemplo, se encuentra en glándulas salivares, células β pancreáticas y próstata (Vallee y Folchuk, 1993; Zaichick et al., 1997). Mientras que en sistema nervioso central el 80% del zinc está unido a proteínas, el resto está principalmente dentro de los almacenes vesiculares, principalmente en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala y el bulbo olfatorio (Cole et al., 1999; Dyck et al., 1993; Frederickson y Moncrieff 1994; Ichinohe y Rockland 2005; Perez-Clausell 1996). El zinc vesicular es liberado por algunas terminales nerviosas glutamatérgicas, alcanzando una concentración extracelular entre 7 y 300 μM (Frederickson et al., 2006; Paoletti et al., 2009). El zinc liberado podría interactuar con diferentes proteínas de membrana, incluyendo receptores a neurotransmisores, canales iónicos y transportadores a neurotransmisores, actuando así como un neuromodulador en el sistema nervioso central (Frederickson et al., 2005; Harrison y Gibbons, 1994).

Así, se sabe que el zinc, modula la función de los receptores nicotínicos (García-Colunga et al., 2001; Hsiao et al., 2001; Moroni et al., 2008; Palma et al., 1998). El zinc incrementa o disminuye la respuesta generada por acetilcolina, dependiendo de la concentración de zinc y de las subunidades que forman al

receptor. Por ejemplo, los receptores nicotínicos $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$ y de neuronas parasimpáticas sólo son inhibidos por zinc (Hsiao et al., 2001; Nutter y Adams, 1995; Palma et al., 1998), mientras que los receptores $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$ son tanto inhibidos como potenciados por zinc (Hsiao et al., 2001). Estudios realizados con mutaciones puntuales sugieren que en el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 4$ los sitios que pueden ser los responsables de la potenciación por zinc son el glutamato 59 y la histidina 162 que se encuentran en las interfases opuestas a los sitios de unión al agonista (Hsiao et al., 2006).

Los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ son los que muestran la mayor potenciación por zinc (Hsiao et al., 2001) y el RNAm para estas subunidades está altamente distribuido en el cerebro de primates y en el hipocampo de rata (Quik et al., 2000; Sudweeks y Yakel, 2000). El zinc ejerce esta modulación al interactuar en las interfases de las subunidades que alternan con las interfases de las subunidades donde se une el agonista (Hsiao et al., 2006), incrementando la duración de las ráfagas del canal activo (Hsiao et al., 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De manera interesante, la nicotina (sustancia responsable de la adicción al tabaco), el zinc (co-liberado por un subconjunto de neuronas glutamatérgicas) y los receptores de acetilcolina nicotínicos (ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central) tienen la característica común de que los tres participan en funciones tales como el desarrollo del cerebro, la memoria y patologías que incluyen la epilepsia, esquizofrenia, ansiedad, depresión, y las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer (Gotti et al., 2006; Jensen et al., 2005; Levin et al., 2006; Mocchegiani et al., 2005; Zhang et al., 2006).

Finalmente, la coexistencia del zinc y los receptores nicotínicos en algunas regiones del sistema nervioso central, y el hecho de que la nicotina aumenta la liberación de glutamato en el área tegmental ventral, el núcleo acumbens, la corteza pre-frontal y el hipocampo (Fallon et al., 2007 Shearman et al, 2005), incrementa la posibilidad de que algunas de estas terminales axónicas podrían co-liberar zinc y glutamato (Frederickson et al., 2005; Paoletti et al., 2009).

HIPÓTESIS

Tomando en cuenta que la nicotina, además de activar los receptores nicotínicos, también los desensibiliza (Buccafusco et al., 2009), y que el grado de desensibilización depende de la concentración y del tiempo de exposición de nicotina (Paradiso y Steinbach, 2003), proponemos la siguiente hipótesis de trabajo: **La regulación de los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ por zinc depende del grado de desensibilización. A mayor desensibilización, menor potenciación por zinc.**

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar cómo son regulados por zinc los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ cuando éstos son activados con diferentes concentraciones de nicotina y diferentes tiempos de incubación con nicotina, a fin de comprender los mecanismos de acción de este catión.

Objetivos Específicos

Establecer cómo se inducen los diferentes grados de desensibilización de la corriente activada con nicotina, en ovocitos que expresan los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$.

Estudiar cómo es afectada por zinc la corriente activada con nicotina. Con el fin de tener diferentes grados de desensibilización, las variables que tomamos en cuenta son:

- a) la concentración de nicotina, de 10 nM a 100 μ M.
- b) el tiempo de exposición de nicotina, de 2 a 60 minutos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología se dividió en dos partes. La primera se enfocó a la obtención del material genético (cDNA, cRNA) que se obtuvo de los clones que codifican para las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 4$ de receptores nicotínicos neuronales. La segunda parte consistió en la disección de la rana para obtener los ovocitos, la inyección del material genético en los ovocitos, y su registro electrofisiológico.

Transformación de bacterias

Un fragmento del DNA de interés que se encuentra unido a un vector, es capaz de replicarse cuando se introduce a una célula huésped (bacterias E-coli), este DNA se reproduce junto con el vector; así se genera una gran cantidad de moléculas de DNA recombinante que posteriormente se purifican para obtener el DNA (Lodish et al.,2002).

Una alícuota de bacterias competentes TB1 se descongeló en hielo, a ésta se le agregaron 5 ng del DNA de interés (los clones que codifican para las subunidades $\alpha 4$ ó $\beta 4$ de receptores nicotínicos) y se le dieron ligeros golpes para agitar toda la solución. Se incubó en hielo durante 30 min. Se colocaron las alícuotas del DNA en un baño de agua a 42 °C durante 50 s. Después, se pasaron a hielo durante 2 min. Se le añadió 200 μ l de medio LB sin ampicilina y se agitaron durante 45 min a 37° C. Una vez terminado el periodo se tomaron 50 μ l y se colocaron sobre una caja de Petri con medio LB/ampicilina en agar esparciéndose la solución con un asa bacteriológica. Se dejó secar el líquido 30 min a

temperatura ambiente. Se guardaron a 37° C durante 16 h con el ágar hacia arriba.

Multiplicación del plásmido

De las colonias de bacterias que se obtuvieron de la transformación, una asa bacteriológica se tomó una colonia de las que se encontraban aisladas. Esta colonia se agregó a 200 ml de medio LB con 25 mg/ml de ampicilina, se agitó en una incubadora con mesa giratoria a 200 rpm a 37° C durante 16 h. Pasado este tiempo, el medio LB donde crecieron las bacterias se colocó en hielo para detener su crecimiento.

Purificación de DNA

A partir de las bacterias, se purificó el DNA utilizando un estuche comercial (Plasmid Maxi Kit, Quiagen).

El cultivo de bacterias se centrifugó a 6,000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante eliminando el exceso del mismo. El botón resultante de los 200 ml de cultivo se resuspendió en 10 ml del amortiguador P1 (50 mM de Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM de EDTA; 100 µg/ml de RNasa A). Para lisar (romper) las células, se agregaron 10 ml del amortiguador P2 (200 mM de NaOH, 1% de SDS), se mezcló la solución y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Pasado este tiempo se le adicionó 10 ml del amortiguador P3 (3.0 M de acetato de potasio, pH 5.5), se mezcló la muestra y se dejó reposar en hielo durante 20 min. Posteriormente se centrifugó a 6,000 rpm a 4 °C durante 30 min. En paralelo a la

centrifugación, se preparó una columna (la cual une las moléculas de DNA y remueve los posibles contaminantes) a la que se le aplicó 10 ml de amortiguador QBT (750 mM de NaCl; 50 mM de MOPS, pH 7.0; 15% de isopropanol; 0.15% de Triton X-100). Después, el líquido resultante de la centrifugación se filtró a través de una gasa limpia y se depositó en la columna, dejando fluir todo el líquido a través de la columna. Al terminar se aplicaron 30 ml de amortiguador QC (1.0 M de NaCl; 50 mM de MOPS, pH 7.0; 15% de isopropanol), al terminar se volvió a aplicar 30 ml de amortiguador QC para lavarlo por segunda vez. La columna se cambió a un tubo de recolección estéril. Para coleccionar los 15 ml de amortiguador QF (1.25 M de NaCl; 50 mM de Tris-Cl, pH 8.5; 15% de isopropanol) que pasaron a través de la columna, se retira la columna y se agregaron 15 ml de iso-propanol a la solución final, se mezclaron y guardaron a -30 °C por 20 min. Después, la muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le añadió 5 ml de etanol al 70%. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante. La pastilla se secó para resuspenderse en 300 µl de agua estéril. La muestra se cuantificó por espectrofotometría, para determinar el DNA circular obtenido, que se guardó a -20 °C hasta ser utilizado.

Linearización con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas de cuatro a ocho pares de bases, denominadas sitios de restricción, y cortan ambas hebras de la molécula del DNA (Lodish et al., 2002).

Para llevar a cabo la linearización, se tomaron 50 μg del DNA (se estimó con base en la concentración del DNA extraído con el estuche Quiagen).

En un tubo Eppendorf se colocaron 50 μg del DNA, 5 μl del amortiguador de la enzima (a una concentración 10X), 0.2 μl de enzima por cada μg de DNA y agua estéril para llevar la reacción a un volumen final es 50 μl . Se mezcló y se centrifugó durante 2 min. Se incubó a 37° C durante 1.5 h. Se corrió un gel de agarosa, con 0.5 μg del DNA linearizado, para asegurarse de que la muestra se haya linearizado.

Purificación del DNA con fenol-cloroformo

La mezcla de reacción del linearizado de DNA se llevó a un volumen de 100 μl con amortiguador TE (1 M de Tris-Cl, 0.5 M de EDTA, pH 8.0). Se le agregó 50 ml de fenol saturado y 50 ml de solución SEGVA (49 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico), se agitó suavemente por 20 s. Posteriormente, se centrifugó 3 min a 10,000 rpm y temperatura ambiente. La fase superior se recuperó en otro tubo, evitando mezclar la muestra con el fenol. Después, se agregó 100 μl de SEGVA, nuevamente se centrifugó por 3 min a 10,000 rpm y temperatura ambiente. Se recuperó la fase superior, del volumen que se recuperó se agregó 0.5 de volumen de acetato de sodio (3 M) a pH 6.0, y 2.5 de volumen de etanol absoluto. La reacción se incubó a -70° C por 15 min. Después, la muestra se centrifugó 20 min a 4 °C a 10,000 rpm. El tubo se decantó y a la pastilla se le agregó etanol al 70% tratado con DEPC, luego se centrifugó 15 min a 4 °C a 10,000 rpm. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 50 μl de

agua estéril desionizada (tratada con 0.1% de DEPC) para obtener una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Transcripción *in vitro*

La transcripción es el mecanismo mediante el cual las células leen y expresan sus instrucciones genéticas. De un mismo gen se pueden hacer muchas copias de RNA, y cada una de estas moléculas de RNA puede dirigir la síntesis de muchas otras moléculas de proteína idénticas. Este proceso se llama transcripción porque la información, aunque se copie en una forma química distinta, sigue estando escrita esencialmente en el mismo lenguaje de los nucleótidos (Alberts et al., 1999).

Para obtener la transcripción *in vitro*, en un tubo de reacción se colocó 10 μl del amortiguador de transcripción 5x, 5 μl de DTT 100 mM (un antioxidante que estabiliza enzimas y proteínas), 5 μl de la mezcla de nucleótidos (5´trifosfato de adenosina (ATP), 5´trifosfato de uridina (UTP), 5´trifosfato de histidina (CTP) 10 mM y 5´trifosfato de guanosina (GTP) 10 mM), 1.25 μl de un análogo de Ribo m⁷G Cap a una concentración de 2.5 mM (que protege el RNA de la digestión intracelular y aumenta la eficacia de la traducción), 5 μg del DNA linearizado, 1.25 μl de RNasin (inhibidor de la ribonucleasa), la RNA polimerasa correspondiente (SP6, T7 ó T3), y al final se agrega agua para llevar la reacción a una concentración final de 50 μl . Una vez adicionado todo, la mezcla se incubó a 37° C durante 2 h. Después, se agregó la misma cantidad de la polimerasa inicial y se incubó por 2 h adicionales. Posteriormente, se adicionó 5 μl de RQ1 DNasa

(remueve el templado de DNA) una unidad de por cada microgramo de DNA linearizado por 15 min, a fin de degradar el DNA. Luego se llevó a cabo la purificación del transcrito con fenol-cloroformo, como previamente se describió para DNA. Sólo que para la purificación de RNA se le agregó 0.5 de volumen de acetato de amonio (7.5 M) y 2.5 de volumen etanol absoluto en lugar del acetato de sodio, finalmente la pastilla se diluyó en 5 μ l de agua y se guardó a -80° C.

Disección de la rana y microinyección de los ovocitos

Para obtener los ovocitos, se anestesió una rana hembra *Xenopus laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI, USA) sumergiéndola en 0.1% de éster etil ácido 3-aminobenzoico y se colocó sobre una cama de hielo. Se extrajeron los ovarios, realizando un corte en la piel de aproximadamente un centímetro en diagonal a la línea media de la región abdominal. Con pinzas de disección y con auxilio de un estereomicroscopio, se separaron ovocitos entre los estadios V y VI, para obtenerlos aislados. Se guardaron en solución de Barth a 18° C que contiene 88 NaCl, 1 KCl, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 2.4 NaHCO₃, 5 HEPES (pH 7.4; NaOH) y 0.1 mg/ml de sulfato de gentamicina.

Al día siguiente, con ayuda de un nanoinyector (World Precision Instruments, Inc), cada ovocito se inyectó con 50 ng de la mezcla del RNA preparada con iguales cantidades del RNA de las subunidades α 4 y β 4 en un volumen de 50 nl de agua. La inyección del material genético fue realizada en el hemisferio vegetal del ovocito. Las micropipetas de inyección fueron fabricadas

con capilares de vidrio (Drumond Scientific) en un estirador de pipetas (Sutter P-30). Después de la inyección, los ovocitos se mantuvieron a 18° C en solución de Barth, renovándola diariamente.

Dos días después de la inyección, la capa folicular que envuelve a los ovocitos fue removida mediante un tratamiento enzimático con 0.5 mg/ml colagenasa tipo 1A durante 1h.

Registro electrofisiológico

Cuatro días después de la inyección de RNA, las corrientes iónicas fueron registradas mediante la técnica de fijación de voltaje con 2 microelectrodos, con 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). Los microelectrodos fueron elaborados con capilares de borosilicato con microfilamento y se llenaron con 3 M de KCl. El ovocito se colocó en una cámara de registro (0.1 ml) con flujo continuo de Ringer Normal que contiene 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES (pH 7.0; NaOH) a temperatura ambiente (20-23°C) a una velocidad de 7-10 ml/min, el potencial de membrana del ovocito se mantuvo a -60 mV en todos los experimentos, cercano al potencial en reposo de las neuronas, que oscila entre -55 y -70 mV. Posteriormente los resultados fueron analizados con los programas de computación Nicolet y Origin (versión 7.0).

Drogas

Los compuestos que se utilizaron para preparar las soluciones de registro electrofisiológico fueron (-)-nicotina di-d-tartrato y cloruro de zinc (Sigma-RBI). Las diluciones se prepararon en Ringer Normal al momento de ser utilizadas, a partir de soluciones concentradas preparadas en Ringer Normal: 0.5 M de (-)-nicotina di-d-tartrato y 100 mM de $ZnCl_2$ con 10 mM HCl (Paoletti et al., 1997).

Análisis de resultados

Las relaciones entre la concentración de nicotina y la corriente control activada por nicotina, así como para la corriente potenciada por zinc activada por nicotina fueron ajustadas con una ecuación que incluye un sitio de activación y un sitio de inhibición para nicotina:

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) \left\{ \frac{1}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{X} \right)^{nH}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{X} \right)^{mH}} \right\},$$

donde I representa la corriente máxima activada con nicotina, I_{\min} es la corriente mínima, I_{\max} es la corriente máxima. Todas las corrientes máximas fueron normalizadas con respecto a la corriente máxima activada con 5 μ M de nicotina. X es la concentración de nicotina, EC_{50} es la concentración de nicotina con la que se obtuvo el 50% de la corriente máxima, la IC_{50} es la concentración de nicotina con la que se obtuvo el 50% de la inhibición máxima, nH es el coeficiente

de Hill para la activación y mH es el coeficiente de Hill para la inhibición, (Harvey et al., 1999).

Para cada concentración de nicotina, la potenciación de zinc fue calculada como 100 veces la relación de la corriente activada por nicotina en presencia de zinc sobre la correspondiente corriente control activada solamente por nicotina, medidas al tiempo al que se obtuvo la corriente máxima en presencia de zinc. La relación entre la concentración de nicotina y el porcentaje de potenciación por zinc de la corriente activada por nicotina fue ajustada con la ecuación de Hill:

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^{nH_i}},$$

donde I representa el porcentaje de la corriente potenciada por zinc y activada con una concentración X de nicotina, I_{\max} es el porcentaje máximo de potenciación por zinc, X es la concentración de nicotina, IC_{50} es la concentración de nicotina con la que se obtiene el 50% de la máxima potenciación de zinc y nH es el coeficiente de Hill.

Estadística

Para el análisis de los datos se usó el programa Origin 7.0 (OriginLab, MA, USA). Los resultados están dados como la media \pm el error estándar. La comparación del valor medio entre los grupos fue obtenido con la prueba t de Student, $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

En este trabajo se evaluaron los efectos de zinc sobre la corriente activada con nicotina en ovocitos de ranas *Xenopus laevis* que expresaban receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$. La corriente a través de los receptores nicotínicos fue activada tanto con diferentes concentraciones de nicotina como por diferentes tiempos de aplicación, con la idea de obtener distintos grados de desensibilización de la respuesta.

Iniciamos con algunos experimentos control. Con el propósito de determinar si el zinc por sí solo generaba una corriente iónica en ovocitos que expresaban receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$; o bien, si la nicotina generaba algún tipo de respuesta en ovocitos control, es decir, ovocitos que no fueron inyectados con las subunidades de receptores nicotínicos; en el primer caso se aplicó 100 μM de zinc, mientras que en el segundo caso se aplicó 100 μM de nicotina. En ambas situaciones durante dos minutos.

Los resultados de la figura 3 muestran lo siguiente. La parte inicial de cada registro corresponde a la corriente iónica cero o corriente basal I_0 , obtenida cuando el ovocito se perfundió solamente con la solución de Ringer Normal. Se aplicaron pulsos de voltaje de 20 mV para marcar el inicio y el final de la perfusión de cada sustancia. En ambos casos observamos que al aplicar zinc (Fig. 3A) o nicotina (Fig. 3B) no hubo ningún cambio en la respuesta.

Los resultados anteriores nos sugieren fuertemente que el zinc (100 μM) no tiene efectos sobre las conductancias nativas del ovocito. También, que los ovocitos no expresan, de manera nativa, receptores de acetilcolina nicotínicos.

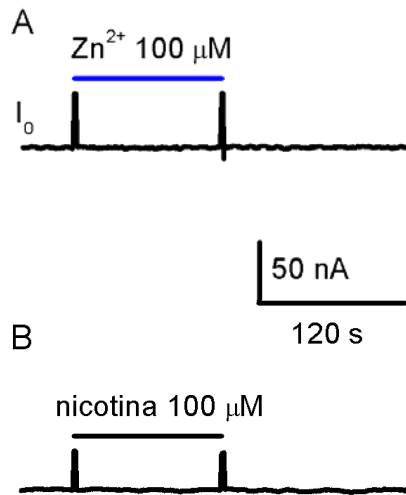


Figura 3. Efectos de zinc y nicotina en ovocitos control. (A) registro de un ovocito que expresaba receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$, al cual se le aplicó $100 \mu M$ de zinc. (B) registro de un ovocito no inyectado, al cual se le aplicó $100 \mu M$ de nicotina. I_0 representa la corriente iónica cero o corriente basal. Cada caso es un experimento representativo de $n = 10$ ovocitos. La membrana del ovocito se fijó a -60 mV en todos los experimentos de este trabajo. En esta y las figuras siguientes el tiempo de aplicación de zinc está indicado por una línea azul en la parte superior de los registros, y el de nicotina por una línea negra. Además, se marcó con pulsos de 20 mV cuando se aplicó o se retiró la sustancia.

Potenciación por zinc de la corriente generada con acetilcolina o nicotina

En la mayoría de los trabajos donde se ha estudiado la modulación de los receptores nicotínicos por zinc, el receptor se activó con acetilcolina (García-Colunga et al., 2001, 2004; Hsiao et al., 2001, 2006, 2008; Moroni et al., 2008; Nutter y Adams, 1995; Palma et al., 1998). En el presente estudio los receptores nicotínicos fueron activados con nicotina.

Para determinar si la potenciación de zinc varía dependiendo del agonista con el que se activan los receptores, en un mismo ovocito que expresaba receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$, se aplicó una concentración baja (200 nM) de acetilcolina, o bien de nicotina, generándose un desplazamiento de la respuesta hacia abajo, lo cual por convención corresponde a una corriente entrante (Fig. 4,Aa, 2Ba). Al adicionar 100 μ M de zinc, la corriente activada con acetilcolina aumentó $504 \pm 97\%$ con respecto a la corriente control ($n = 4$, Fig. 4Ab), mientras que la corriente generada con nicotina aumentó $1912 \pm 460\%$ ($n = 4$, Fig. 4Bb). En ambos casos, la corriente activada con el agonista se recuperó al retirar el zinc de la perfusión.

Nótese que la potenciación por zinc es mucho mayor cuando se activan los receptores nicotínicos con nicotina que cuando se activan con acetilcolina. Así, los efectos potenciadores de zinc dependen del agonista con el que se genera la corriente iónica.

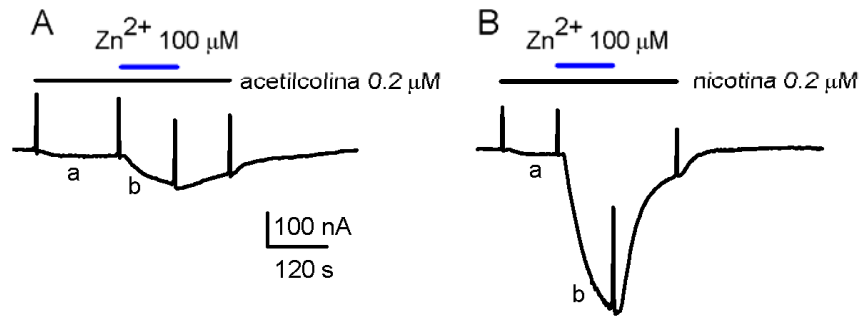


Figura 4. Efecto de zinc sobre la corriente activada con acetilcolina (A) y con nicotina (B). La corriente control activada con acetilcolina o nicotina está marcada con (a), mientras que la corriente en presencia de zinc está marcada con (b). Estos registros fueron obtenidos del mismo ovocito. Ejemplo representativo de $n = 4$ ovocitos de distintas ranas.

Efectos de zinc en función de la concentración de nicotina

Una vez que se encontró que la potenciación por zinc fue mucho mayor cuando la corriente se activó con nicotina que con acetilcolina, se procedió a estudiar con más detalle estos efectos. Así, se determinó la potenciación por zinc en función de la concentración de nicotina.

Las respuestas control activadas por nicotina variaron de acuerdo a la concentración de nicotina. Bajas concentraciones de nicotina (10-50 nM) no generaron una corriente iónica detectable, concentraciones intermedias (100-1000 nM) produjeron corrientes que no decayeron después de dos minutos de aplicación de nicotina (Fig. 5A); altas concentraciones de nicotina (5-100 μ M) generaron corrientes que alcanzaron una respuesta máxima, después de la cual decayó la corriente, aun en presencia continua de nicotina (Fig. 5B). Está bien documentado que este decaimiento se debe principalmente a la desensibilización de una fracción de receptores y que depende de la concentración de nicotina (Fenster et al., 1997).

Después de dos minutos de registrada la corriente control, se adicionó zinc (100 μ M) durante otros dos minutos. Con esta concentración de zinc se obtiene la máxima potenciación de la corriente activada por acetilcolina en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ (Hsiao et al., 2001; 2006). Si bien las corrientes iónicas generadas por 10-100 nM de nicotina fueron muy pequeñas, el zinc aumentó considerablemente esta respuesta activada por nicotina (Fig. 5A flechas, recuadro). Además, el aumento de la corriente activada por nicotina ocurrió a todas las concentraciones de nicotina probadas; no obstante, el grado de

potenciación de la corriente disminuyó conforme la concentración de nicotina aumentó (Fig. 5A, B).

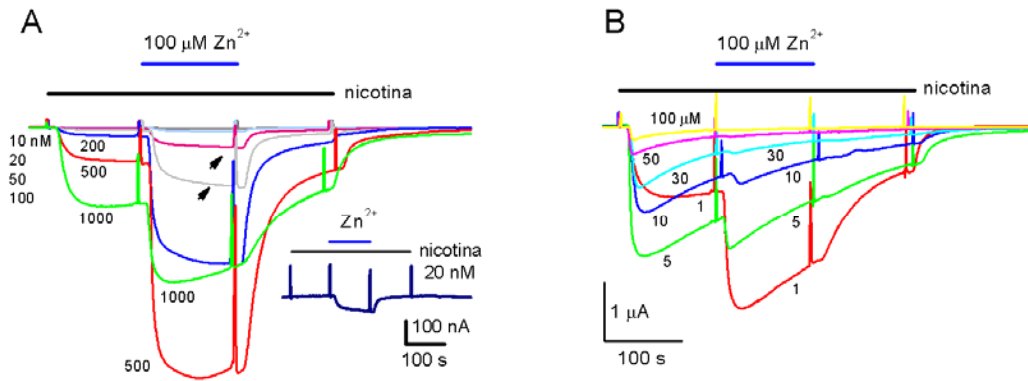


Figura 5. Efecto de zinc en función de la concentración de nicotina. Trazos ilustrativos superpuestos de la corriente registrada con concentraciones bajas (A) y altas (B) de nicotina en presencia de $100 \mu\text{M}$ de zinc, en ovocitos que expresaron receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$. Los números a la izquierda en (A) corresponden a las concentraciones de nicotina, de 10 a 100 nM, donde la corriente iónica aún no es detectable (trazos gris oscuro, verde claro, rosa, gris claro); los números cerca de cada trazo corresponden a la concentración de nicotina con la que se activó la corriente (en nM, A y en μM , B). Las flechas señalan las corrientes activadas con 50 y 100 nM de nicotina y en presencia de zinc. **Inserto:** corriente reescalada, activada con 20 nM de nicotina y en presencia de zinc. Todos los registros fueron obtenidos en un solo ovocito y son representativos de 3 – 15 ovocitos. de distintas ranas.

Por otro lado, la relación entre la concentración de nicotina y la corriente control activada con nicotina mostró que la amplitud de la corriente aumentó al aumentar la concentración de nicotina, entre 10 nM y 5 μ M, con esta última se alcanzó el valor máximo de la corriente (Fig. 6, círculos rojos). Con concentraciones mayores, la amplitud de la corriente disminuyó al aumentar la concentración de nicotina, entre 5 y 100 μ M, probablemente debido al bloqueo del canal iónico del receptor por la misma nicotina (Maconochie y Steinbach, 1995). Nótese que el zinc aumentó la respuesta activada por nicotina con todas las concentraciones de nicotina probadas (Fig. 6, triángulos verdes).

Las concentraciones de nicotina con las que se obtuvo el 50% de la corriente máxima, EC_{50} , y el 50% de la inhibición máxima, IC_{50} , fueron 639 ± 46 nM y 14.7 ± 2.2 μ M, para la corriente control activada solamente con nicotina, con sus correspondientes coeficientes de Hill $nH = 2.2 \pm 0.13$ y $mH = 1.8 \pm 0.11$, respectivamente. En presencia de zinc estos parámetros cambiaron: $EC_{50} = 160 \pm 21$ nM e $IC_{50} = 4.6 \pm 0.3$ μ M de nicotina, con coeficientes de Hill $nH = 2.6 \pm 0.19$ y $mH = 1.5 \pm 0.09$, respectivamente. Nótese que, tanto la EC_{50} como la IC_{50} fueron menores en presencia de zinc en comparación con los controles, probablemente debido a un aumento en la sensibilidad de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ a la nicotina para ambos sitios, el de activación y el de inhibición.

La potenciación de zinc en función de la concentración de nicotina se muestra en la figura 6 (círculos azules). La máxima potenciación por zinc se obtuvo cuando los receptores nicotínicos se activaron con 50 nM de nicotina ($2530\% \pm 385\%$, es decir, aproximadamente 25 veces más grande que la corriente

control activada sólo con nicotina). Esta potenciación gradualmente disminuyó al aumentar la concentración de nicotina (entre 50 nM y 5 μ M de nicotina), aún cuando la corriente control fue aumentando. El efecto del zinc fue menor (aproximadamente 124% de la corriente control activada sólo con nicotina) para concentraciones mayores de nicotina (entre 10 y 100 μ M). La IC_{50} fue 287 ± 34 nM de nicotina con un nH de 1.8 ± 0.11 . Los datos para cada concentración de nicotina fueron obtenidos de 4-15 ovocitos de distintas ranas.

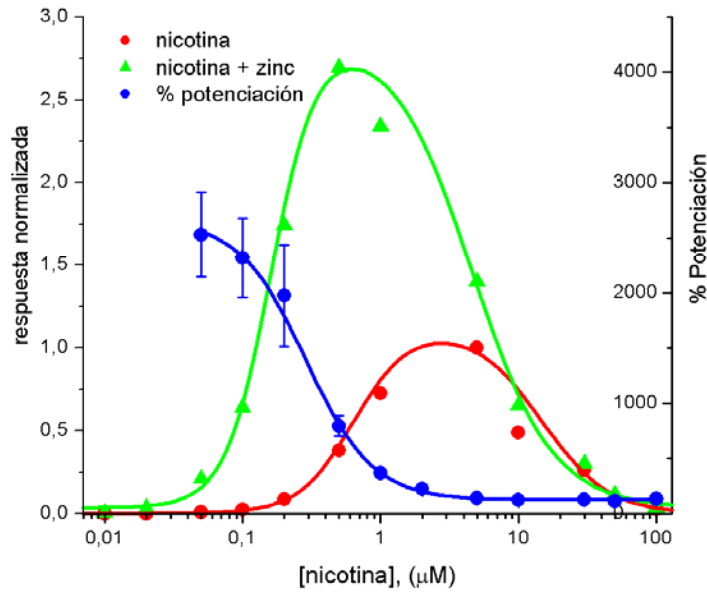


Figura 6. Efectos de zinc dependientes de la concentración de nicotina. Gráficas de la amplitud de la corriente control activada sólo con nicotina (círculos rojos), de la amplitud de la corriente potenciada por 100 μM de zinc (triángulos verdes) y del porcentaje de potenciación por zinc de la corriente activada con nicotina (círculos azules), todas en función de la concentración de nicotina. Las líneas continuas corresponden a los ajustes con la ecuación de Hill (ver Materiales y Métodos). Los datos son la media ± el error estándar de 4-15 ovocitos de distintas ranas.

Dado que la potenciación por zinc gradualmente disminuyó al aumentar la concentración de nicotina, al igual que la potenciación de la respuesta de acetilcolina en receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ (Hsiao et al., 2001), lo que nos sugiere en primera instancia es que el zinc está actuando competitivamente con la nicotina. Sin embargo, con mutaciones puntuales en la subunidad $\alpha 4$ se determinó que los sitios de unión asociados al efecto potenciador del zinc se encuentran en dos de las interfases subunidad-subunidad que alternan con las dos interfases que unen a la acetilcolina (Hsiao et al., 2006). Lo cual descarta que el zinc y la nicotina interactúen en los mismos sitios. No obstante, un mecanismo compatible con los resultados arriba descritos podría ser que la potenciación ejercida por el zinc dependa del grado de desensibilización.

Dado que el grado de desensibilización depende de la concentración del agonista (Paradiso y Steinbach, 2003), que se ve reflejada en el decaimiento de la respuesta. Cuando se normalizaron las corrientes generadas por diferentes concentraciones de nicotina (5-100 μM) de los registros de la figura 5B (Fig. 7), se observó que conforme aumentó la concentración de nicotina la corriente decayó más rápido. A su vez el efecto potenciador del zinc disminuyó, hasta quedar casi anulado cuando los receptores nicotínicos se activaron con 50 y 100 μM (Fig. 6, círculos azules; Fig. 7).

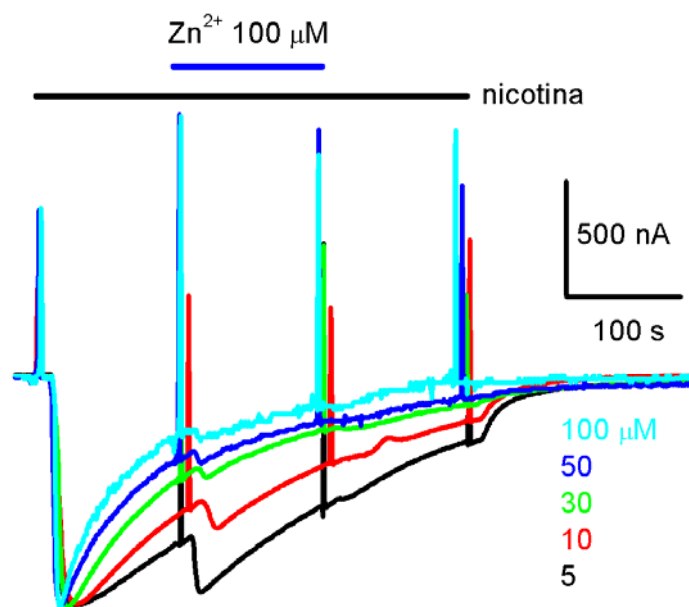


Figura 7. Efecto del zinc en función de la concentración de nicotina. Trazos superpuestos y normalizados de la corriente registrada con diferentes concentraciones de nicotina en presencia de zinc, en ovocitos que expresaron receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$. Los registros son los mismos de la Fig. 5B.

Diferentes grados de desensibilización

Con la finalidad de obtener diferentes grados de desensibilización, a los ovocitos que expresaban receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ se les aplicó dos concentraciones de nicotina (500 nM y 2 μ M) durante un tiempo relativamente prolongado (~1 h). En la figura 8 se muestran dos trazos obtenidos de dos ovocitos. La parte inicial de cada registro corresponde a la corriente iónica cero o corriente basal, I_0 , obtenida cuando el ovocito se perfundió solamente con Ringer Normal. En ambos casos, la respuesta decayó aun en presencia de nicotina, reflejo principalmente de la desensibilización de una fracción de receptores.

En este ejemplo ilustrativo, con 500 nM de nicotina la magnitud máxima de la corriente fue de 562 nA, después de una hora decayó a 175 nA, 31% de la corriente máxima (Fig. 8A). En otro ovocito, 2 μ M de nicotina generó una corriente de 1174 nA, después de una hora la corriente decayó a 42 nA, 3% de la corriente máxima (Fig. 8B). Este decaimiento fue mucho mayor comparado con el decaimiento de la corriente activada con 500 nM de nicotina.

Una manera en que estimamos el nivel de desensibilización fue el tiempo en el que la magnitud de la corriente activada con nicotina decayó al 50% de la respuesta máxima, $t_{1/2}$, (Fig. 8, líneas punteadas azules). Así, $t_{1/2} = 32$ min ($n = 3$) para la corriente activada con 500 nM de nicotina y $t_{1/2} = 5$ min ($n = 3$) para la activada con 2 μ M de nicotina.

Así, la desensibilización de la respuesta depende tanto de la concentración de nicotina como del tiempo de exposición a nicotina. El decaimiento de la respuesta y por lo tanto la desensibilización fue más rápida con una concentración

mayor de nicotina. También, a una misma concentración de nicotina el grado de desensibilización aumentó al aumentar el tiempo de exposición de nicotina.

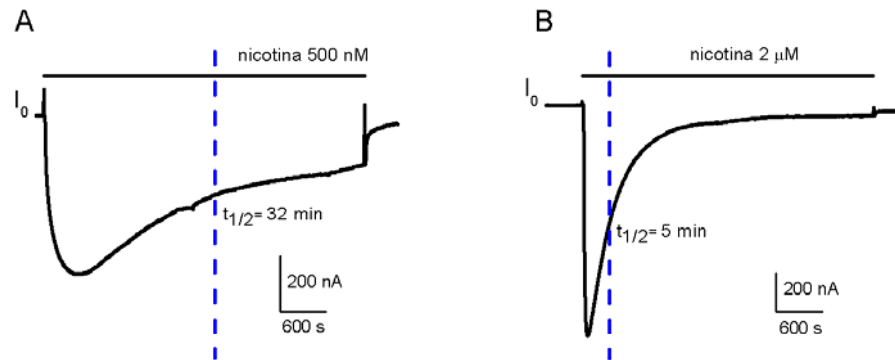


Figura 8. Diferentes grados de desensibilización. Corriente activada con 500 nM (A) y 2 μ M (B) de nicotina en ovocitos que expresaban receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$. La corriente iónica cero o corriente basal está marcada como I_0 . Las líneas punteadas verticales indican el tiempo en el que la corriente decae al 50% de la respuesta máxima ($t_{1/2}$). Cada uno de los registros es un ejemplo de $n = 3$ experimentos de distintas ranas.

Efectos de zinc en receptores nicotínicos a diferentes tiempos de aplicación de nicotina.

Se sabe que la desensibilización de los receptores nicotínicos depende tanto del tiempo de exposición como de la concentración del ligando. Altas concentraciones de nicotina, así como exposiciones prolongadas de nicotina incluso a bajas concentraciones, resultan en una mayor desensibilización de la respuesta a nicotina (Fenster et al., 1997; Paradiso y Steinbach, 2003; Pidoplichko et al., 1997).

Para lograr diferentes grados de desensibilización, realizamos experimentos en ovocitos que expresaron receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$, a los cuales se les aplicaron diferentes concentraciones de nicotina: 100 nM (una concentración cercana a la EC_3 de nicotina), 500 nM (una concentración cercana a la EC_{40} de nicotina [Fig. 6], que corresponde aproximadamente a la EC_2 de acetilcolina en receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ de humano [Chavez-Noriega et al., 1997]) y 2 μ M (concentración con la cual se obtiene la máxima respuesta de nicotina). Además, con cada una de estas concentraciones de nicotina, el ovocito fue expuesto por diferentes tiempos: 2, 5, 10 y 20 min. Después de cada uno de estos tiempos, se adicionó 100 μ M de zinc por 2 min. El ovocito se regresó a la concentración original de nicotina por 2 min adicionales. Entre cada aplicación de nicotina, el ovocito fue lavado durante 20 min con la solución de Ringer Normal.

La figura 9 muestra la corriente activada con 100 nM de nicotina a diferentes tiempos de 2, 5 10 y 20 min (Fig. 9). Nótese que la respuesta control no decayó durante la exposición de nicotina. Por ejemplo, la potenciación por zinc fue de $1392 \pm 222\%$, $n = 10$ después de 2 min con nicotina y de $1103 \pm 515\%$, $n = 4$ después de 20 min de aplicación de nicotina. Estos datos no fueron significativamente diferentes.

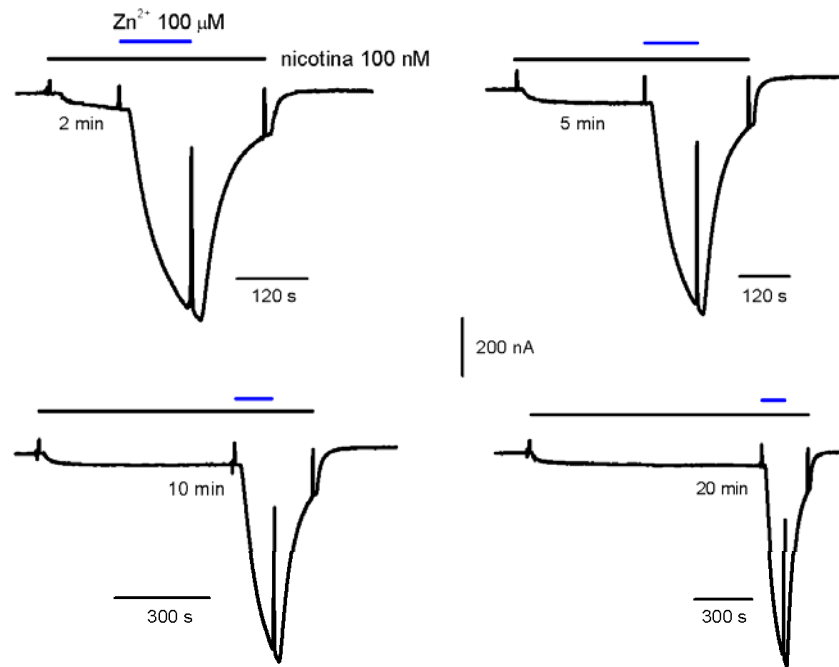


Figura 9. Efectos del zinc expuestos a diferentes tiempos de nicotina. La corriente iónica fue activada con 100 nM de nicotina durante 2, 5, 10 y 20 min en ovocitos que expresaban receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$. Después de estos tiempos con nicotina, se adicionó 100 μ M de zinc (líneas azules arriba de los registros). Los registros fueron obtenidos de un mismo ovocito y el tiempo de lavado con solución de Ringer Normal entre cada registro fue de 20 min. Experimento representativo de $n = 4$ ovocitos de distintas ranas.

Cuando la corriente fue activada con 500 nM de nicotina, la corriente en presencia de zinc disminuyó relativamente poco al aumentar el tiempo de exposición a nicotina (Figura 10). Así, la potenciación por zinc fue de $901 \pm 113\%$, $n = 7$ después de 2 min con nicotina y de $813 \pm 53\%$ $n = 4$ después de 20 min de exposición con nicotina. Estos datos no fueron significativamente diferentes.

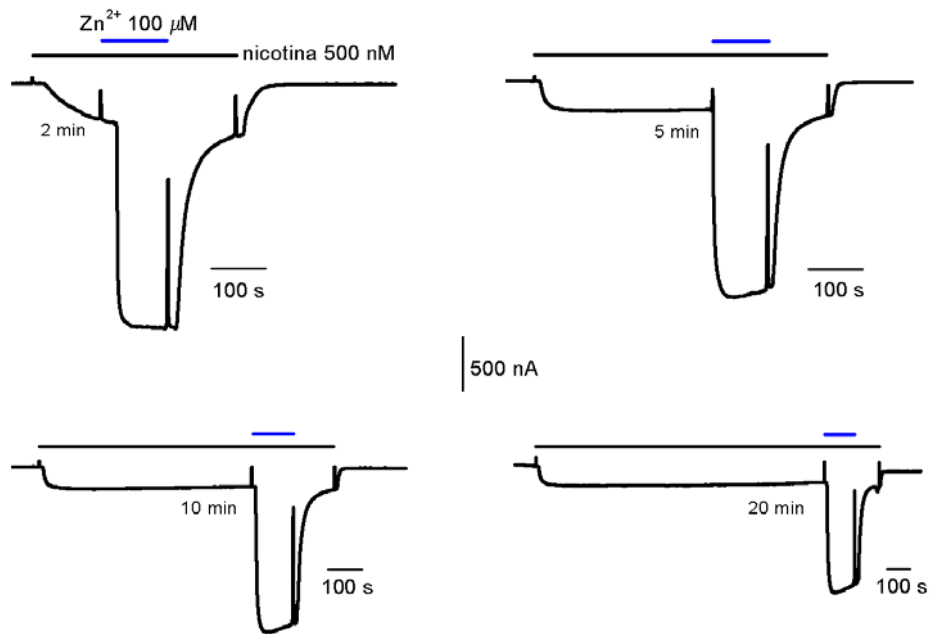


Figura 10. Efectos del zinc expuestos a diferentes tiempos de nicotina. La corriente iónica fue activada con 500 nM de nicotina durante 2, 5, 10 y 20 min. Las condiciones experimentales fueron similares a las de la figura 9. Los registros fueron obtenidos de un mismo ovocito y el tiempo de lavado con solución de Ringer Normal entre cada registro fue de 20 min. Experimento representativo de $n = 4$ ovocitos de distintas ranas.

Finalmente, la figura 11 muestra que la magnitud de la corriente activada con 2 μM de nicotina disminuyó con las subsecuentes aplicaciones de nicotina. Además, en presencia de nicotina, la respuesta decayó más rápido que con bajas concentraciones de nicotina, debido a la desensibilización de una mayor fracción de los receptores. Si bien, la magnitud de la corriente adicional en presencia de zinc fue más pequeña cuando los ovocitos fueron expuestos por tiempos largos a 2 μM de nicotina, la potenciación ejercida por zinc de la corriente activada por nicotina fue ligeramente mayor; sin embargo, los datos no fueron significativamente diferentes. Así, comparando la potenciación por zinc de la primera aplicación con la de la última tenemos que la potenciación por zinc fue $220 \pm 32\%$, $n = 7$ después de 2 min con nicotina y de $250 \pm 20\%$, $n = 4$ después de 20 min de exposición con nicotina.

De los resultados arriba descritos, es evidente que para las tres concentraciones de nicotina, la potenciación por zinc de la corriente activada por nicotina permanece aproximadamente constante al aumentar el tiempo de exposición a la nicotina.

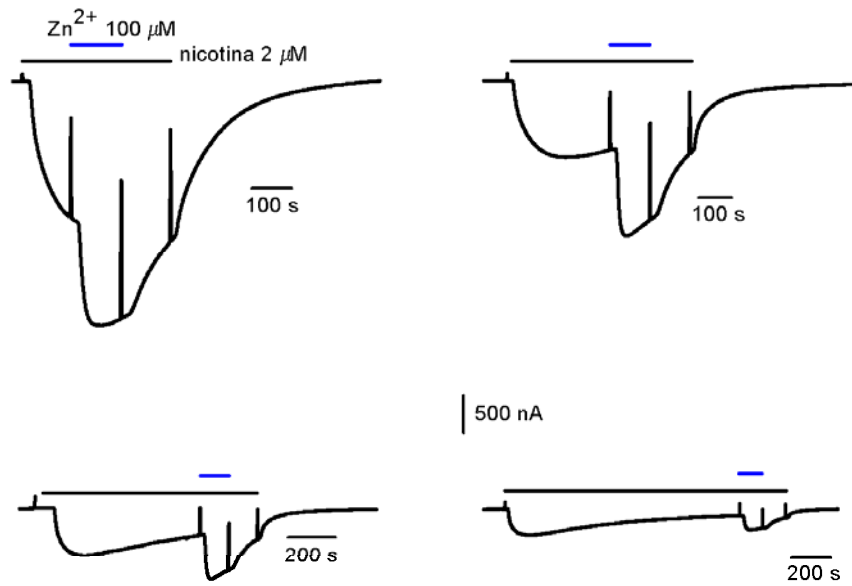


Figura 11. Efectos de zinc a diferentes tiempos de aplicación de nicotina. La corriente iónica fue activada con 2 μM de nicotina durante 2, 5, 10 y 20 min. Las condiciones experimentales fueron similares a las de la figura 9. Los registros fueron obtenidos de un mismo ovocito y el tiempo de lavado con solución de Ringer Normal entre cada registro fue de 20 min. Experimento representativo de $n = 4$ ovocitos de distintas ranas.

Efectos de zinc durante tiempos prolongados de aplicación de nicotina

En el protocolo previo, los intervalos de lavado con solución de Ringer Normal entre cada aplicación de nicotina fueron relativamente largos (20 min), lo cual posiblemente permitió la recuperación de los receptores de la desensibilización. Por esta razón, los ovocitos que expresaron receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ fueron expuestos continuamente a nicotina por tiempos más largos (50 min) a fin de obtener mayor desensibilización. Como en los experimentos previos, la corriente fue activada con 100, 500 nM ó 2 μ M de nicotina. Después de 2 min de exposición a nicotina, se adicionó zinc durante 2 min a intervalos de 10 min, en continua presencia de nicotina, para no permitir la recuperación de la desensibilización.

La figura 12 ilustra ejemplos representativos. La corriente iónica fue activada con 100 nM (Fig. 12A), 500 nM (Fig. 12B) y 2 μ M (Fig. 12C) de nicotina. En el primer caso la potenciación por zinc de la corriente activada con nicotina fue de $1321 \pm 193\%$, $n = 7$ y de $505 \pm 74\%$ $n = 4$ después de 2 y 48 min de exposición continua de nicotina, respectivamente. Estos datos fueron significativamente diferentes. Mientras que la potenciación por zinc de la corriente activada con 2 μ M de nicotina fue de $249 \pm 48\%$ $n = 4$ y de $110 \pm 55\%$, $n = 4$ después de 2 y 48 min de exposición continua de nicotina, respectivamente. Estos datos no fueron significativamente diferentes.

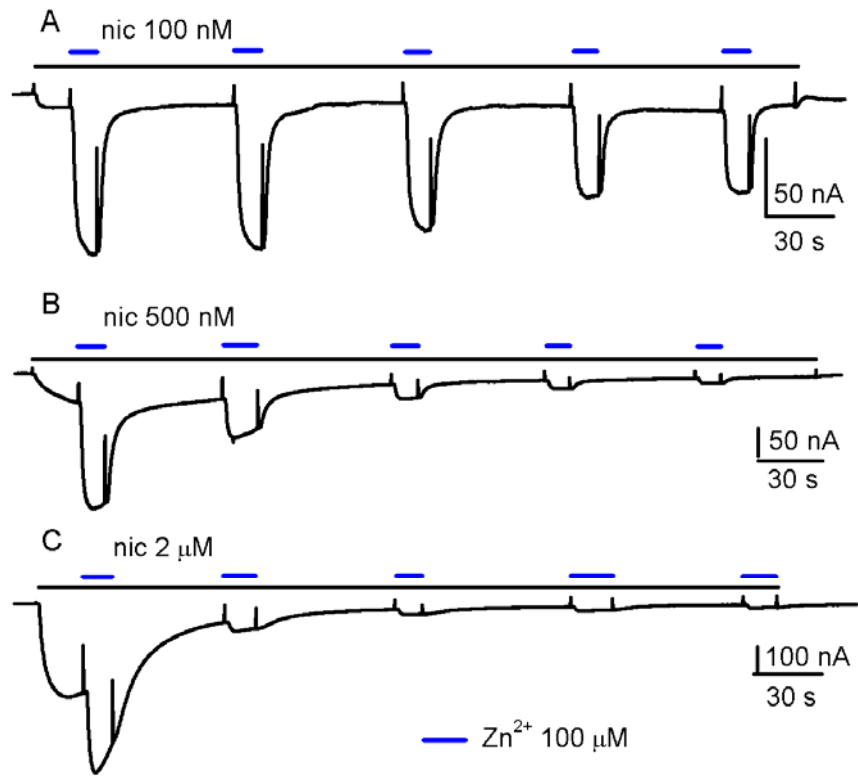


Figura 12. Efectos de zinc durante tiempos prolongados de aplicación de nicotina. La corriente iónica fue generada con 100 nM (A), 500 nM (B) y 2 μM (C) de nicotina durante 50 min. Los registros fueron obtenidos de diferentes ovocitos que expresaban receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$. Las líneas azules indican el tiempo de aplicación de zinc durante la aplicación continua de nicotina (líneas negras). Cada uno es un experimento representativo de $n = 4$ ovocitos de distintas ranas.

La figura 13 resume los datos obtenidos por los dos protocolos en los que la nicotina se aplicó por tiempos prolongados. En ambos casos, la potenciación por zinc de la corriente activada con nicotina disminuyó conforme aumentó la concentración de nicotina.

La potenciación por zinc no cambió considerablemente cuando la exposición de nicotina aumentó con aplicaciones intermitentes de nicotina y lavados de 20 min (Fig. 13A), mientras que la potenciación por zinc disminuyó cuando el tiempo de exposición de nicotina aumentó durante la aplicación continua de nicotina (Fig. 13B).

Por ejemplo, en el primer caso, con nicotina 500 nM la potenciación por zinc permaneció aproximadamente constante: $901 \pm 113\%$, $n = 7$ después de 2 min con nicotina, y $813 \pm 53\%$, $n = 4$ después de 20 min de exposición con nicotina (Fig.13A). En el segundo caso, la potenciación por zinc disminuyó significativamente de $721 \pm 80\%$ ($n = 4$) para 2 min de nicotina a $310 \pm 78\%$ ($n = 4$) para 24 min de exposición continua de nicotina (Fig.13B) ($P < 0.05$).

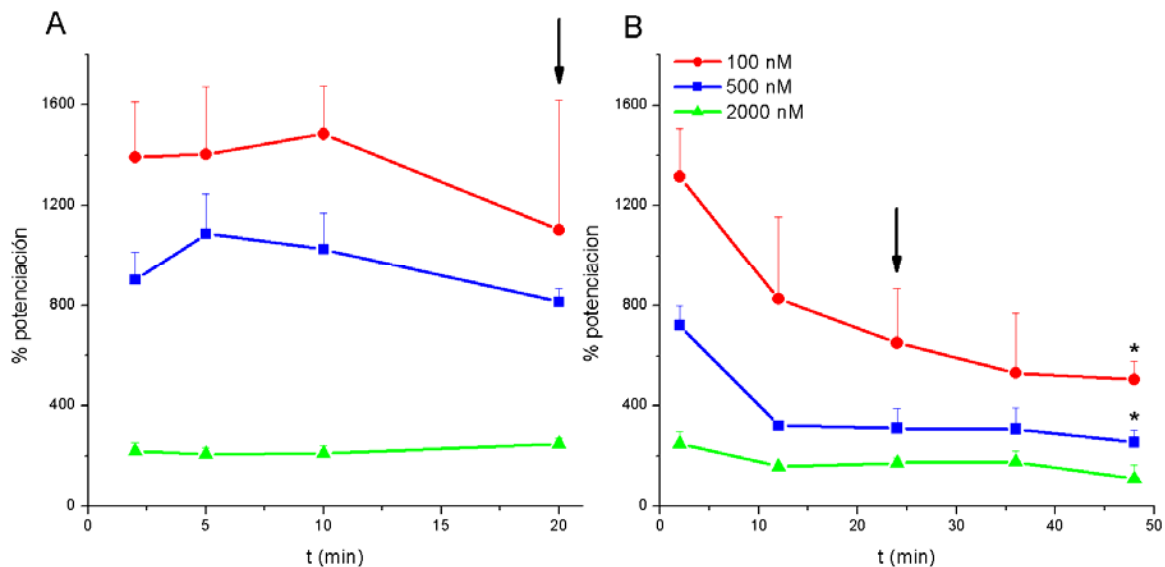


Figura 13. Efectos de zinc en función del tiempo de exposición a nicotina. Porcentaje de potenciación por zinc de la corriente activada por nicotina en función del tiempo de exposición de nicotina, con intervalos de 20 min de lavado entre cada aplicación de nicotina **(A)** y durante una aplicación continua de nicotina **(B)**. Las flechas indican el tiempo equivalente de la exposición de nicotina con ambas formas de aplicación. Los resultados son la media más el error estándar. * $P < 0.05$ la potenciación por zinc después de 48 min de exposición continua comparada con la potenciación a los 2 min de exposición de nicotina, con la misma concentración de nicotina, $n = 4 - 7$ experimentos.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar cómo son regulados por zinc los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ cuando éstos son activados con diferentes concentraciones y expuestos a diferentes tiempos de nicotina.

En la mayoría de los estudios sobre la modulación de los receptores nicotínicos por zinc, el receptor se activó con acetilcolina (García-Colunga et al., 2001, 2004; Hsiao et al., 2001, 2006, 2008; Moroni et al., 2008; Nutter y Adams, 1995; Palma et al., 1998). En el presente estudio los receptores nicotínicos fueron activados con nicotina, un agonista exógeno y el principal componente adictivo del tabaco (Le Houezec, 2003; Lukas, 2007).

Para asegurar que los efectos del zinc son resultado de su interacción con los receptores nicotínicos, aplicamos zinc en ovocitos que expresaban receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$, así como nicotina en ovocitos control. En ambos casos no se detectaron cambios en la corriente iónica basal. Lo cual indicó que los ovocitos control no expresan de manera nativa receptores nicotínicos y que el zinc por sí mismo no es capaz de activar receptores nicotínicos.

De manera interesante, en este trabajo se encontró que 100 μ M de zinc potenció los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ cuando éstos fueron activados con concentraciones muy bajas de nicotina (por ejemplo, 20 nM), concentración que se alcanza fácilmente en el cerebro humano al fumar un solo cigarro, ya que la concentración de nicotina que se alcanza es de 50 nM después de 10-20 s (Henningfield et al., 1993; Le Houezec, 2003).

También se encontró que el zinc es más efectivo para potenciar a los receptores nicotínicos cuando son activados con nicotina que cuando son activados con acetilcolina. Así, la corriente activada con 50 nM de nicotina se incrementó por la presencia de 100 μ M de zinc cerca de 25 veces, con respecto a la corriente activada solamente con 50 nM de nicotina. En contraste, cuando la corriente fue activada con acetilcolina, la potenciación con la misma concentración de zinc fue sólo de aproximadamente 5 veces la corriente control (Fig. 4, ver también Hsiao et al., 2001; 2006).

Adicionalmente, la mayoría de los receptores nicotínicos neuronales, incluyendo los subtipos $\alpha 4\beta 4$, son más sensibles a la nicotina que a la acetilcolina (Chavez–Noriega et al., 1997). De este modo, para los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ la concentración a la que se alcanza el 50% de la corriente máxima (EC_{50}) para la nicotina es de 5-11 μ M y para la acetilcolina es de 19-74 μ M (Chavez–Noriega et al., 1997; Fenster et al., 1997; Hsiao et al., 2001; 2006). Además, el zinc incrementa la sensibilidad de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ para ambos ligandos; la EC_{50} para acetilcolina disminuye en presencia de 50 μ M de zinc de 74 a 23 μ M (Hsiao et al., 2001). Por otro lado, la EC_{50} para la nicotina disminuye en presencia de 100 μ M de zinc de 639 nM a 160 nM (Vázquez-Gómez y García-Colunga, 2009). Esto es similar a lo que ocurre en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, donde con 100 μ M de zinc la EC_{50} para acetilcolina disminuye de 89 a 34 μ M (Moroni et al., 2008).

Aunque el papel que juega el zinc en la modulación de los receptores nicotínicos y en la adicción a la nicotina es desconocido, el zinc potencia la

mayoría de los receptores nicotínicos (García-Colunga et al., 2001; García-Colunga et al., 2004; Hsiao et al., 2001). Este evento podría estar ocurriendo incluso en situaciones en las cuales existen concentraciones muy bajas de nicotina, como en la gente que fuma o en gente tratada con nicotina. También podría ocurrir en regiones del cerebro en las cuales el zinc se co-libera con glutamato y que además hay receptores nicotínicos, como en la neocorteza, corteza periforme, hipotálamo, amígdala, estriado (Dani y Bertrand, 2007; Danscher y Stoltenberg, 2005; Paoletti et al., 2009). De este modo el zinc podría llegar a receptores nicotínicos presinápticos o no sinápticos (Lendvai y Vizi, 2008), incrementando el tiempo de apertura de los canales iónicos individuales (Hsiao et al., 2008) y de este modo el aumento de la liberación de neurotransmisores.

El hecho de que la potenciación por zinc se ve disminuida cuando se aumenta la concentración de acetilcolina (Hsiao et al., 2001) o nicotina (Vázquez-Gómez y García-Colunga 2009) podría sugerir una competencia entre el zinc y el agonista por algunos sitios de unión. Con altas concentraciones de nicotina, el zinc incrementa la sensibilidad de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ al agonista, disminuyendo la concentración de nicotina a la que se inhibe el 50% de la corriente máxima (IC_{50}) de 14.7 μM en ausencia de zinc a 4.6 μM en la presencia de 100 μM de zinc. Además, con esta concentración inhibidora de nicotina (5 μM), la potenciación por zinc fue menor ($140 \pm 12\%$) que la potenciación a bajas concentraciones de nicotina (a 50 nM, $2530 \pm 385\%$). Esto indica que en presencia de zinc los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ tienen mayor afinidad por nicotina tanto para el sitio de activación como para el sitio de inhibición. Si hubiera competencia

ente el zinc y la nicotina por los mismos sitios, al adicionar zinc la tendencia sería que éste interaccionara con los receptores nicotínicos, disminuyendo la probabilidad de interacción de la nicotina con los receptores. No obstante, los receptores nicotínicos presentan mayor afinidad por la nicotina en presencia de zinc, descartando así competitividad entre ambas sustancias.

Con relación a lo anterior, se ha determinado que el glutamato 59 y la histidina 162 de la subunidad $\alpha 4$ de los receptores nicotínicos son mediadores moleculares para la función potenciadora del zinc. Estos sitios se localizan en las interfases de las subunidades que alternan a los sitios de unión al agonista (Hsiao et al., 2006), descartando así competencia entre el zinc y la nicotina. De este modo, podría ocurrir un mecanismo adicional, en el cual la potenciación por zinc podría depender del grado de desensibilización de la respuesta activada por nicotina. Se sabe que altas concentraciones del agonista hacen más compleja la función del receptor; su activación, desensibilización y el bloqueo del canal iónico por el propio agonista (Katz y Thesleff, 1957; Maconochie y Steinbach, 1995).

Con tiempos de exposición prolongados y concentraciones bajas de nicotina (100 a 500 nM), la potenciación por zinc fue diferente, dependiendo si la nicotina fue lavada entre aplicación y aplicación o si la exposición de nicotina fue continua. En el primer caso, la potenciación por zinc se mantuvo aproximadamente constante conforme se aumentó el tiempo de exposición a nicotina, quizá debido a que el tiempo de lavado dio tiempo a que los receptores se recuperaran de la desensibilización. En contraste, con exposiciones prolongadas y continuas de nicotina la potenciación por zinc disminuyó. Así, en

presencia continua de nicotina no hay tiempo para la recuperación de la desensibilización. Además, se sabe que el estado desensibilizado del receptor tiene mayor afinidad por el agonista (Katz y Thesleff, 1957). En estas condiciones se podrían estar modificando de manera alostérica los sitios de interacción para el zinc, reduciendo su sensibilidad y por lo tanto reduciendo su efecto potenciador.

El zinc y la nicotina se han relacionado con una gran variedad de patologías neuronales, incluyendo la esquizofrenia, la ansiedad, la depresión, las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson (Gotti et al., 2006; Levin et al., 2006; Mocchegiani et al., 2005; Takeda et al., 2007). Resulta interesante considerar algunas situaciones en las cuales estas sustancias se administran crónicamente. Por ejemplo, la administración de zinc incrementa los depósitos del zinc sináptico en el hipocampo de rata (Szewczyk et al., 2006). Por otro lado, se ha sugerido que la administración crónica de nicotina podría mejorar la enfermedad de Alzheimer, la depresión y la adicción al tabaco (Le Houezec, 2003; Newhouse et al., 2001; Salín-Pascual et al., 1996).

Además, de la activación endógena de los receptores nicotínicos por acetilcolina y su modulación por zinc, podrían ocurrir diferentes situaciones por la exposición a nicotina. La modulación por zinc depende de la composición y la estequiometría de los receptores nicotínicos, de su localización regional en el sistema nervioso central, de la localización celular de los receptores nicotínicos, de la concentración de acetilcolina y/o de nicotina, de la concentración de zinc y del estado funcional de los receptores nicotínicos, entre otros. Así, resultaría interesante tomar en consideración estas sustancias para el desarrollo de nuevos ligandos de receptores nicotínicos para su uso clínico.

CONCLUSIONES

El presente estudio muestra que el zinc potencia los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$.

El zinc es más efectivo para potenciar la corriente generada con nicotina que la generada con acetilcolina.

Los receptores nicotínicos presentan mayor afinidad por la nicotina en presencia de zinc.

La potenciación por zinc de los receptores nicotínicos depende de la concentración y el tiempo de exposición a nicotina.

La potenciación por zinc de los receptores nicotínicos es grande con bajas concentraciones de nicotina o con una exposición breve de nicotina, mientras que dicha potenciación es débil con altas concentraciones de nicotina o exposiciones prolongadas de nicotina, sugiriendo que la modulación de los receptores nicotínicos por zinc depende además del grado de desensibilización del receptor.

Estos resultados podrían contribuir a entender mejor las funciones y disfunciones del sistema nervioso central en las que participan el zinc, la nicotina y los receptores nicotínicos, o que podrían participar los tres de manera conjunta.

BIBLIOGRAFÍA

- Agid Y, Bonnet AM, Ruberg M, Javoy-Agid F. 1985. Pathophysiology of L-dopa-induced abnormal involuntary movements. *Psychopharmacology Suppl* 2: 145-159.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1999. Del DNA a las proteínas. Pp 217-246 En: *Introducción a la neurobiología*. Editorial omega. Barcelona.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89: 73-120.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Mike A, Eisenberg HM, Maelicke A, Alkondon M. 2000. Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance. *Behav Brain Res* 113: 131-141.
- Alkondon M, Albuquerque EX. 2004. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog Brain Res* 145: 109-120.
- Alkondon M, Albuquerque EX. 2005. Nicotinic receptor subtypes in rat hippocampal slices are differentially sensitive to desensitization and early in vivo functional up-regulation by nicotine and to block by bupropion. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 740–750.
- Arias HR. 1998. Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1376: 173-220.
- Aronstam RS. 1981. Interactions of tricyclic antidepressants with a synaptic ion channel. *Life Sci* 28: 59-64.

- Barceloux DG. 1999. Zinc. *J Toxicol Clin Toxicol* 37: 279-292.
- Bartus RT. 2000. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol* 163: 495-529.
- Benowitz NL. 2008. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther* 83: 531-534.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 517-529.
- Bohler S, Gay S, Bertrand S, Corringier PJ, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D. 2001. Desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors conferred by N-terminal segments of the $\beta 2$ subunit. *Biochemistry* 40: 2066-2074.
- Borodavka IK. 1989. Relation of serum levels of serotonin and histamine and the presence of depressive syndrome in patients with duodenal ulcer. *Klin Med* 67: 102-104.
- Broide RS, Leslie FM. 1999. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* 20: 1-16.
- Buccafusco JJ, Beach JW, Terry AV Jr. 2009. Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 364-370.
- Burghaus L, Schütz U, Krempel U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Wevers A, Lindstrom J, Schröder H. 2000 Quantitative assessment of nicotinic

acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 385-388.

Caldarone BJ, Harrist A, Cleary MA, Beech RD, King SL, Picciotto MR. 2004. High-affinity nicotinic acetylcholine receptors are required for antidepressant effects of amitriptyline on behavior and hippocampal cell proliferation. *Biol Psychiatry*. 56: 657-664.

Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, Van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK. 2004. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 25: 907-914.

Cens T, Nargeot J, Charnet P. 1997 Ca^{2+} -permeability of muscle nicotinic acetylcholine receptor is increased by expression of the ϵ subunit. *Receptors Channels* 5: 29-40.

Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Léna C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux JP. 2003. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23: 7820-7829.

Changeux J, Edelstein SJ. 2001 Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol* 11: 369-377.

Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Johnson, EC. 1997. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $h\alpha 2\beta 2$, $h\alpha 2\beta 4$, $h\alpha 3\beta 2$, $h\alpha 3\beta 4$, $h\alpha 4\beta 2$, $h\alpha 4\beta 4$

and $\alpha 7$ expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 346–356.

Clementi F, Fornasari D, Gotti C. 2000. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from structure to therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 21: 35-37.

Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD. 1999. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the *ZnT3* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1716-1721.

Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56: 2-5.

Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL. 1994. Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. *Brain Res* 653: 278-284.

Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 431-458.

Costa AC, Patrick JW, Dani JA. 1994. Improved technique for studying ion channels expressed in *Xenopus* oocytes, including fast superfusion. *Biophys J* 67: 395-401.

Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA. 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem* 281: 24085-2489.

Dani JA, De Biasi M. 2001. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 70: 439-446.

- Dani JA, Bertrand D. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 699–729.
- Danscher G, Stoltenberg, M. 2005. Zinc-specific autometallographic in vivo selenium methods: tracing of zinc-enriched (ZEN) terminals, ZEN pathways, and pools of zinc ions in a multitude of other ZEN cells. *J Histochem Cytochem* 53: 141-153.
- Dyck R, Beaulieu C, Cynader M, 1993. Histochemical localization of synaptic zinc in the developing cat visual cortex. *J Comp Neurol* 329: 53-67.
- Fallon S, Shearman E, Sershen H, Lajtha A. 2007 The effects of glutamate and GABA receptor antagonists on nicotine-induced neurotransmitter changes in cognitive areas. *Neurochem Res* 32: 535-553.
- Feldman SR, Meyer SM, Quenzer FL. 1999. Acetylcholine neurochemistry: Síntesis, storage, release, and inactivation. Pp 235-248. In: *Principles of neuropsychopharmacology*, 1a. Ed. Feldman SR, Meyer SM, Quenzer FL, Sinauer Associates, Inc., publisher. Sunderland, Massachusetts.
- Fenster CP, Rain,s MF, Noerager B, Quick, MW, Lester RA, 1997. Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J Neurosci* 17: 5747-5759.
- Fergusson SM, Brodtkin JD, Lloyd GK, Menzaghi F. 2003. ntidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression. *Psychopharmacology* 152: 295-303.

- Frances A, Pincus HA, First MB. Mood disorders. |999. En: Diagnostical and statistical manual of mental disorders (DSM-IV). Fourth edition: 317-338.
- Frederickson CJ, Giblin LJ, Krezel A, McAdoo DJ, Mueller RN, Zeng Y, Balaji RV, Masalha R, Thompson RB, Fierke CA, Sarvey JM, de Valdenebro M, Prough DS, Zornow MH. 2006. Concentrations of extracellular free zinc (pZn)_e in the central nervous system during simple anesthetization, ischemia and reperfusion. *Exp Neurol* 198: 285-293.
- Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI. 2005. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 449-462.
- Frederickson CJ, Moncrieff DW. 1994. Zinc-containing neurons. *Biol Signals* 3: 127-139.
- Freund TF, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470.
- Fryer JD, Lukas RJ. 1999. Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurochem* 72: 1117–1124.
- Fucile S. 2004. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35: 1–8.
- Fucile S, Palma E, Mileo AM, Miledi R, Eusebi F. 2000. Human neuronal threonine-for-leucine-248 α 7 mutant nicotinic acetylcholine receptors are highly Ca²⁺ permeable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3643-3648.
- García-Colunga J, Awad JN, Miledi R. 1997. Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2041-2044.

- García-Colunga J, González-Herrera M, Miledi R. 2001. Modulation of $\alpha 2\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors by zinc. *Neuroreport* 12: 147–150.
- García-Colunga J, Vázquez-Gómez E, Miledi, R. 2004. Combined actions of zinc and fluoxetine on nicotinic acetylcholine receptors. *Pharmacogenomics J* 4: 388–393.
- Gomez CM, Maselli RA, Vohra BP, Navedo M, Stiles JR, Charnet P, Schott K, Rojas L, Keeseey J, Verity A, Wollmann RW, Lasalde-Dominicci J. 2002. Novel delta subunit mutation in slow-channel syndrome causes severe weakness by novel mechanisms. *Ann Neurol* 51: 102-112.
- Gotti C, Riganti L, Vailati S, Clementi F. 2005. Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Curr Pharm Des* 12: 407-428.
- Gotti C, Zoli M, Clementi F. 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 27: 482-491.
- Guan ZZ, Zhang X, Ravid R, Nordberg A. 2000. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 74: 237-243.
- Haghighi AP, Cooper E. 2000. A molecular link between inward rectification and calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 2$ receptors. *J Neurosci* 20: 529-541.
- Han ZY, Le Novère N, Zoli M, Hill JA, Jr, Champtiaux N, Changeux JP. 2000. Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *Eur J Neurosci* 12: 3664-3674.

- Harrison NL, Gibbons SJ. 1994. Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* 33: 935-952.
- Harvey RJ, Thomas P, James CH, Wilderspin A, Smart TG. 1999. Identification of an inhibitory Zn²⁺ binding site on the human glycine receptor α 1 subunit. *J Physiol* 520: 53-64.
- Hasey G, Hanin I. 1991. The cholinergic-adrenergic hypothesis of depression reexamined using clonidine, metoprolol, and physostigmine in an animal model. *Biol Psychiatry* 29: 127-138.
- Hawkins JW. 1997. Antidepressant effects of nicotine. *J Clin Psychiatry* 58: 324-325.
- Henningfield JE, Stapleton JM, Benowitz, NL, Grayson RF, London ED. 1993. Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend* 33: 23-29.
- Hsiao B, Dweck, D, Luetje CW. 2001. Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J. Neurosci* 21: 1848–1856.
- Hsiao B, Mihalak KB, Magleby KL, Luetje CW. 2008. Zinc potentiates neuronal nicotinic receptors by increasing burst duration. *J Neurophysiol* 99: 999-1007.
- Hsiao B, Mihalak KB, Repicky SE, Everhart D, Mederos AH, Malhotra A, Luetje CW. 2006. Determinants of zinc potentiation on the α 4 subunit of neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol* 69: 27-36.
- Hughes JR. 1986. Nicotine gum to treat panic attacks? *Am J Psychiatry* 143: 271.
- Ichinohe N, Rockland KS. 2005. Distribution of synaptic zinc in the macaque monkey amygdala. *J Comp Neurol* 489: 135-147.

- Ishikawa A, Miyatake T. 1993. Effects of smoking in patients with early-onset Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 117: 28-32.
- Jensen AA, Frølund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P. 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem* 48: 4705–4745.
- Ji D, Lape R, Dani JA. 2001. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 31: 131–141
- Karlin A. 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors, *Nat Rev Neurosci* 3: 102– 114.
- Katz B, Thesleff S. 1957. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 138: 63-80.
- Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Kimura J, Kume T, Kochiyama H, Maeda T, Akaike A. 1997 Nicotinic receptor stimulation protects neurons against β -amyloid toxicity. *Ann Neurol* 42: 159-63.
- Kumari V, Postma P. 2005. Nicotine use in schizophrenia: the self medication hypotheses. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1021–1034.
- Lang AE, Obeso JA. 2004. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol* 3: 309-316.
- ~~Le Houezec J. 2003. Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review *Int J Tuberc Lung Dis* 7: 811–819.~~
- Le Novère N, Corringer PJ, Changeux JP. 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53: 447–456.

- Lendvai B, Vizi ES. 2008. Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. *Physiol Rev* 88: 333–349.
- Levenson CW. 2006. Zinc: the new antidepressant? *Nutr* 64: 39-42.
- Levin ED. 2002. Ed. *Nicotinic Receptors in the Nervous System*; CRC Press: Boca Raton, FL.
- ~~Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH. 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl)* 184: 523–539.~~
- Lodish H, Arnold B, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell. 2002. DNA recombinante y genómico. pp. 207-253. En: *Biología Celular y Molecular*. Editorial panamericana.
- López-Váldez H, Garcia-Colunga J. 2001. Antagonism of nicotinic acetylcholine receptors by inhibitors of monoamine uptake. *Mol Psychiatry*. 6: 511-519.
- López-Valdés, García-Colunga. 2003. La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud Mental* 26: 66-72.
- Luetje CW, Patrick J. 1991. Both α - and β -subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 11: 837-845.
- Lukas RJ. 2007. Pharmacological effects of nicotine and nicotinic receptor subtype pharmacological profiles. pp. 3-23. En: *Medication Treatments for Nicotine Dependence* Editor TP George. Taylor & Francis Group, LLC. CRC Press, Boca Rata, FL.

- MacDonald RS. 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* 130(5S Suppl), 1500S-1508S.
- Maconochie DJ, Steinbach JH. 1995. Block by acetylcholine of mouse muscle nicotinic receptors, stably expressed in fibroblasts. *J Gen Physiol* 106: 113-147.
- Mao C, Zhang H, Xiao D, Zhu L, Ding Y, Zhang Y, Wu L, Xu Z, Zhang L. 2008. Perinatal nicotine exposure alters AT 1 and AT 2 receptor expression pattern in the brain of fetal and offspring rats. *Brain Res* 1243: 47-52.
- Markou A. 2008. Review. Neurobiology of nicotine dependence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 3159-168.
- Martin-Ruiz CM, Court JA, Molnar E, Lee M, Gotti C, Mamalaki A, Tsouloufis T, Tzartos S, Ballard C, Perry RH, Perry EK. 1999. $\alpha 4$ but not $\alpha 3$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 73: 1635-1640.
- Mihailescu S, Drucker-Colín R. 2000. Nicotine and brain disorders. *Acta Pharmacol Sin* 21: 97-104.
- Millar NS, Gotti C. 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56: 237-346.
- Mocchegiani E, Bertoni-Freddari C, Marcellini F, Malavolta M. 2005. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog Neurobiol* 75: 367-390.
- Moroni M, Vijayan R, Carbone A, Zwart R, Biggin PC, Bermudez I. 2008. Non-agonist-binding subunit interfaces confer distinct functional signatures to the

alternate stoichiometries of the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor: an $\alpha 4$ - $\alpha 4$ interface is required for Zn^{2+} potentiation. *J Neurosci* 28: 6884-6894.

Newhouse PA, Potter A, Kelton M, Corwin J. 2001. Nicotinic treatment of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 49: 268-278.

Nguyen HN, Rasmussen BA, Perry DC. 2003. Subtype-selective up-regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 1090-1097.

Nikolaus S, Antke C, Müller HW. 2009. In vivo imaging of synaptic function in the central nervous system: I. Movement disorders and dementia. *Behav Brain Res* 204: 1-31.

Nishizaki T, Sumikawa K. 1998. Effects of PKC and PKA phosphorylation on desensitization of nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res* 812: 242-245.

Nutter TJ, Adams DJ. 1995. Monovalent and divalent cation permeability and block of neuronal nicotinic receptor channels in rat parasympathetic ganglia. *J Gen Physiol* 105: 701-723.

Oteiza PI, Mackenzie GG. 2005. Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health. *Mol Aspects Med* 26: 245-255.

Palma E, Maggi L, Miledi R, Eusebi F. 1998. Effects of Zn^{2+} on wild and mutant neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10246-10250.

Paoletti P, Ascher P, Neyton J. 1997. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* 17: 5711-5725.

Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M. 2009. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158: 126-136.

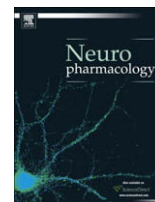
- Paradiso KG, Steinbach JH. 2003. Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors. *J Physiol* 553: 857-871.
- Paterson D, Nordberg A. 2000 Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 61: 75-111.
- Pérez-Clausell J. 1996. Distribution of terminal fields stained for zinc in the neocortex of the rat. *J Chem Neuroanat* 11: 99-111.
- Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS, Brunzell DH, 2008. It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Prog Neurobiol* 84: 329-342.
- Picciotto MR. 2003. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci* 24: 493-499.
- Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA. 1997. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390: 401-404.
- Placzek AN, Zhang TA, Dani JA. 2009. Age dependent nicotinic influences over dopamine neuron synaptic plasticity. *Biochem Pharmacol* 78: 686-692.
- Quik M, Bordia T, O'Leary K. 2007. Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 74: 1224-1234.
- Quik M, Polonskaya Y, Gillespie A, Jakowec M, Lloyd GK, Langston JW. 2000. Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. *Comp Neurol* 11: 58-69.

- Quik M, Polonskaya Y, Kulak JM, McIntosh JM. 2001. Vulnerability of ^{125}I - α -conotoxin MII binding sites to nigrostriatal damage in monkey. *J Neurosci* 21: 5494-5500.
- Ragozzino D, Barabino B, Fucile S, Eusebi F. 1998. Ca^{2+} permeability of mouse and chick nicotinic acetylcholine receptors expressed in transiently transfected human cells. *J Physiol* 507: 749-757.
- Rana B, McMorn SO, Reeve HL, Wyatt CN, Vaughan PF, Peers C. 1993. Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by imipramine and desipramine. *Eur J Pharmacol* 250, 247-251.
- Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Mulle C, Hussy N, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. 1991. Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* 353 :846-849.
- Salín-Pascual RJ, Alcocer-Castillejos NV, Alejo-Galarza G. 2003 Nicotine dependence and psychiatric disorders. *Rev Invest Clin* 55: 677-693.
- Salín-Pascual RJ, Drucker-Colin R. 1998. A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport* 5: 57-60.
- Salín-Pascual RJ, Rosas M, Jimenez-Genchi A, Rivera-Meza BL, Delgado-Parra V. 1996. Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in nonsmoking patients with major depression. *J Clin Psychiatry* 57: 387-389.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR. 2004. Parkinson's disease. *Lancet*. 363: 1783-1793.

- Séguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. 1993. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13: 596-604.
- Shearman E, Rossi S, Sershen H, Hashim A, Lajtha A. 2005. Locally administered low nicotine-induced neurotransmitter changes in areas of cognitive function. *Neurochem Res* 30: 1055-1066.
- Shen JX, Yakel JL. 2009. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin* 30: 673-680.
- Sine SM. 2002. The nicotinic receptor ligand binding domain. *J Neurobiol* 53: 431-446.
- Sudweeks SN, Yakel JL. 2000. Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol* 3: 515-528.
- Szewczyk B, Sowa M, Czupryn A, Wierońska JM, Brański P, Sadlik K, Opoka W, Piekoszewski W, Smiałowska M, Skangiel-Kramaska J, Pilc A, Nowak G. 2006. Increase in synaptic hippocampal zinc concentration following chronic but not acute zinc treatment in rats. *Brain Res* 1090: 69-75.
- Takeda A, Tamano H, Kan F, Itoh H, Oku N. 2007. Anxiety-like behavior of young rats after 2-week zinc deprivation. *Behav Brain Res* 177: 1-6.
- Terry AV. Jr. Buccafusco JJ. 2003. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 821-827.

- Turner JR, Kellar KJ. 2005. Nicotinic cholinergic receptors in the rat cerebellum: multiple heteromeric subtypes. *J Neurosci* 5: 9258-9265.
- Unwin N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* 346: 967-989.
- Vallee BL, Falchuk KH. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73: 79-118.
- Vázquez-Gómez E, García-Colunga J. 2009. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are modulated by zinc. *Neuropharmacology* 56: 1035-1040.
- Vázquez-Palacios SG, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J. 2004. Antidepressant-like effects of the acute and chronic administration of nicotine in the rat forced swimming test and its interaction with fluoxetine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 78: 165–169.
- Villarroel A, Sakmann B. 1996. Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development. *J Physiol* 496: 331-338.
- Vincent A, McConville J, Farrugia ME, Newsom-Davis J. 2004. Seronegative myasthenia gravis. *Semin Neurol* 24: 125-133.
- Vizi ES, Lendvai B. 1999. Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Rev* 30: 219–235.
- Wang H, Sun X. 2005. Desensitized nicotinic receptors in brain. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 420-437.
- Weiss JH, Sensi SL, Koh JY. 2000. Zn²⁺: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci* 21: 395-401.

- Zaichick V Ye, Sviridova TV, Zaichick SV. 1997. Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *Int Urol Nephrol* 29: 565-574.
- Zhang J, Liu Q, Chen Q, Liu NQ, Li FL, Lu ZB, Qin C, Zhu H, Huang YY, He W, Zhao BL. 2006. Nicotine attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity by regulating metal homeostasis. *FASEB J* 20: E399-E408.
- Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C, 2002. Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci* 22: 8785-8789.
- Zouridakis M, Zisimopoulou P, Poulas K, Tzartos SJ. 2009. Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB Life* 61: 407-423.



Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are modulated by zinc

Elizabeth Vázquez-Gómez, Jesús García-Colunga*

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro 76230, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2008

Received in revised form

14 January 2009

Accepted 26 February 2009

Keywords:

Cations

Nicotine

Modulation of nicotinic receptors

Xenopus oocytes

ABSTRACT

It is known that zinc modulates nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Here, we studied the effects of zinc on neuronal $\alpha 4\beta 4$ nAChRs, expressed in *Xenopus* oocytes and activated by nicotine. Membrane ion currents elicited by nicotine (10 nM to 100 μ M) were enhanced by zinc (100 μ M). Maximal zinc potentiation of the nicotine-activated current (2530%) occurred at 50 nM nicotine, and potentiation gradually decreased as the nicotine concentration increased. The EC_{50} and IC_{50} for the nicotine-activated current were 639 nM and 14.7 μ M nicotine, respectively. Both parameters decreased in the presence of zinc to 160 nM and 4.6 μ M, respectively, probably due to an increase of sensitivity of nAChRs for nicotine. We used different concentrations and durations of exposure to nicotine, due to desensitization of nAChRs directly depends on both these factors. With 500 nM nicotine and 20 min washing periods between nicotine applications, zinc potentiation remained constant, 901% for 2 min and 813% for 20 min of nicotine exposure. With continuous application of nicotine, zinc potentiation decreased as the time of nicotine exposure increased, 721% for 2 min and 254% for 48 min of nicotine exposure. Our results indicate that zinc-potentiating effects on $\alpha 4\beta 4$ nAChRs strongly depend on both concentration and time of exposure to nicotine, suggesting that zinc potentiation depends on the degree of desensitization.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ligand-gated cation channels that belong to the same gene superfamily as γ -aminobutyric acid (GABA; types A and C), 5-hydroxytryptamine (5-HT; type 3), and glycine receptors (Le Novère et al., 2002). Neuronal nAChRs are pentameric proteins composed of distinct subunits ($\alpha 2$ – $\alpha 10$ and $\beta 2$ – $\beta 4$) and are widely distributed in the brain (Dani and Bertrand, 2007; Jensen et al., 2005). Fast nicotinic synaptic transmission in the peripheral nervous system is mediated by postsynaptic nAChRs, whereas central nAChRs are predominantly presynaptic and influence the release of neurotransmitters: e.g. 5-HT, glutamate, GABA, norepinephrine, acetylcholine (ACh), and dopamine (Dani and Bertrand, 2007; Lendvai and Vizi, 2008).

On the other hand, zinc is present in neurons that are widely distributed throughout the nervous system and is released from a subset of glutamatergic nerve endings, reaching an extracellular concentration of 7–300 μ M (Frederickson et al., 2006; Paoletti et al., 2009). Released zinc can interact with several membrane proteins including neurotransmitter receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters, acting thus as an endogenous modulator

in the central nervous system (Frederickson et al., 2005; Harrison and Gibbons, 1994).

Like many endogenous and exogenous substances including 5-HT, anesthetics, antidepressants (Arias et al., 2006), zinc modulates the function of nAChRs (García-Colunga et al., 2001; Hsiao et al., 2001; Moroni et al., 2008; Palma et al., 1998). Zinc both potentiates and inhibits the response of most nAChRs to ACh, depending on the zinc concentration and subunit composition of the receptors, but zinc only inhibits $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 2$, and rat parasympathetic neuronal nAChRs (Hsiao et al., 2001; Nutter and Adams, 1995; Palma et al., 1998). The $\alpha 4\beta 4$ nAChR shows the highest zinc potentiation (Hsiao et al., 2001). The mRNAs for these subunits are widely distributed in the primate brain and in the rat hippocampus (Quik et al., 2000; Sudweeks and Yakel, 2000). Zinc exerts this modulation acting at the subunit–subunit interfaces that alternate with interfaces that bind the agonist (Hsiao et al., 2006), increasing the burst duration of the active channel (Hsiao et al., 2008).

Interestingly, nicotine (the main substance responsible for tobacco addiction), zinc (co-released from a subset of glutamatergic neurons), and nAChRs (widely distributed throughout CNS) have the following features in common: all are involved both in functions such as brain development, learning, memory, and in pathologies including epilepsy, schizophrenia, anxiety, major depression, and Parkinson's and Alzheimer's diseases (Gotti et al., 2006; Jensen et al., 2005; Levin et al., 2006; Mocchegiani et al.,

* Corresponding author. Tel./fax: +52 442 2381063.

E-mail address: garcia@inb.unam.mx (J. García-Colunga).

2005; Zhang et al., 2006). Thus, the aim of this paper was to study the effects of zinc on neuronal $\alpha 4\beta 4$ nAChRs activated by nicotine, that may help to better understand the interplay between zinc and nicotine and their interactions with nAChRs in the function and malfunction of the brain.

2. Materials and methods

The preparation of cRNA, oocyte injection, and electrical recordings has been described elsewhere (García-Colunga et al., 2004). Briefly, cRNAs encoding the rat neuronal $\alpha 4$ and $\beta 4$ nAChR subunits were transcribed *in vitro*. All experimental manipulations were in accord with the ethical policies of animal care and handling of the Universidad Nacional Autónoma de México, with an effort to minimize the number of animals used and their suffering. *Xenopus laevis* oocytes were dissected from segments of ovary and maintained at 16 °C in Barth's solution containing (in mM): 88 NaCl, 1 KCl, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 2.4 NaHCO₃, 5 HEPES (pH 7.4; NaOH), and 0.1 mg/ml gentamicin sulfate. The next day each oocyte was injected with 0.5–50 ng of the cRNA mixture, prepared with equal quantities of $\alpha 4$ and $\beta 4$ subunit RNAs in a volume of 50 nl water, and 2 days later the oocytes were treated with collagenase type I (140 U/ml for 0.5–1 h). Membrane currents elicited by nicotine were recorded 3–9 days after RNA injection using a voltage-clamp technique with two microelectrodes. Oocytes were placed in a recording chamber (0.1 ml) and continuously perfused with Ringer's solution containing (in mM): 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, and 5 HEPES (pH 7.0; NaOH) at room temperature (20–23 °C) and at a rate of 7–10 ml/min. ZnCl₂ and (–)-nicotine hydrogen tartrate salt were from Sigma-RBI. The nicotine stock solution (500 mM) was diluted in Ringer's solution. The ZnCl₂ stock solution (100 mM) was prepared by serial dilutions with bidistilled water of a solution containing 100 mM ZnCl₂ and 10 mM HCl (Paoletti et al., 1997). Unless otherwise indicated, the oocyte membrane potential was maintained at –60 mV.

Nicotine concentration–response relationships for the control nicotine-activated current as well as for the nicotine-activated current potentiated by zinc were fitted with an equation that included one activating site and one inhibiting site for nicotine:

$$I = I_{\min} + (I_{\max} - I_{\min}) \left\{ \frac{1}{1 + (EC_{50}/X)^{n_H}} - \frac{1}{1 + (IC_{50}/X)^{m_H}} \right\},$$

where I represents the peak current elicited at a given nicotine concentration X ; I_{\min} is the minimal elicited current; I_{\max} is the maximal elicited current. All peak currents were normalized to the maximal control current elicited by 5 μ M nicotine. EC_{50} and IC_{50} are the concentrations of nicotine corresponding to half-maximal activation and half-maximal inhibition, respectively; n_H and m_H are the Hill coefficients for activation and inhibition, respectively (Harvey et al., 1999).

For each nicotine concentration, zinc potentiation was calculated as 100 times the ratio of the current elicited by nicotine in the presence of zinc over the corresponding control current elicited by nicotine alone, measured at the time when maximal current occurred in the presence of zinc. The nicotine concentration–response relationship for the zinc-potentiated, nicotine-activated current was fitted with the Hill equation:

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + (X/IC_{50})^{n_H}},$$

where I represents the percent potentiation of the nicotine-activated current by zinc at a given nicotine concentration X ; I_{\max} is the maximal percent potentiation by zinc; IC_{50} is the concentration of nicotine yielding half-maximal zinc potentiation; and n_H is the Hill coefficient.

Data analyses were performed using Microcal Origin 7 (OriginLab, MA, USA) software. The results are given as the mean \pm standard error. Comparisons of the mean values among groups were performed by Student's t -test, $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of zinc as a function of nicotine concentration

The effects of zinc on membrane currents elicited by nicotine were analyzed in *Xenopus* oocytes expressing rat neuronal $\alpha 4\beta 4$ nAChRs. Control nicotine-activated responses varied according to the nicotine concentration. Low nicotine concentrations (10–50 nM) did not evoke detectable ion currents; intermediate concentrations (100–1000 nM) elicited currents that did not decay after 2 min of nicotine application (Fig. 1A); high concentrations (5–100 μ M) elicited currents that reached a peak and then declined

with time, even in the continued presence of nicotine (Fig. 1B). This decay is mainly due to receptor desensitization, and depends on nicotine concentration (Fenster et al., 1997).

Zinc (100 μ M) was added to the perfusion for 2 min in the presence of nicotine. This zinc concentration allows maximal potentiation of the ACh-induced current through $\alpha 4\beta 4$ nAChRs (Hsiao et al., 2001, 2006). Although ion currents elicited by 10–100 nM nicotine were very small, zinc considerably enhanced these nicotine-activated responses (Fig. 1A, arrows, inset). The extent of enhancement of the nicotine-activated current by zinc decreased as the concentration of nicotine increased (Fig. 1A and B).

On the other hand, the control nicotine concentration–current relationship shows that the amplitude of the nicotine-activated current increased as the nicotine concentration increased from 10 nM to 5 μ M (Fig. 1C, filled circles). Then, the amplitude of the nicotine-activated current decreased as nicotine concentration increased further, from 5 to 100 μ M nicotine, probably due to blockade of the ion channel by nicotine itself (Maconochie and Steinbach, 1995). Note that zinc enhanced nicotine-activated responses at all nicotine concentrations tested (Fig. 1C, triangles).

The half-maximal activation, EC_{50} , and half-maximal inhibition, IC_{50} , were 639 ± 46 nM and 14.7 ± 2.2 μ M nicotine for the control current elicited by nicotine alone, with their corresponding Hill coefficients $n_H = 2.2 \pm 0.13$ and $m_H = 1.8 \pm 0.11$, respectively. In the presence of zinc these parameters were altered: $EC_{50} = 160 \pm 21$ nM and $IC_{50} = 4.6 \pm 0.3$ μ M nicotine, with Hill coefficients $n_H = 2.6 \pm 0.19$ and $m_H = 1.5 \pm 0.09$, respectively. These results show that EC_{50} and IC_{50} were significantly lower in the presence of zinc than in the controls, probably due to an increased sensitivity of $\alpha 4\beta 4$ nAChRs to nicotine at both the activating and inhibiting sites.

Zinc potentiation as a function of the nicotine concentration is shown in Fig. 1C (open circles). Maximal zinc potentiation was obtained at 50 nM nicotine ($2530 \pm 385\%$, i.e. ~ 25 times the control current elicited by nicotine alone). This potentiation gradually decreased as the nicotine concentration increased (between 50 nM and 5 μ M nicotine), even when the control current was rising. The zinc effect was smaller (just 124% of the control current elicited by nicotine alone) for higher concentrations of nicotine (10–100 μ M). The IC_{50} was 287 ± 34 nM nicotine and n_{HI} was 1.8 ± 0.11 . Data for each nicotine concentration were obtained from 4 to 15 oocytes.

3.2. Effects of zinc at different times of nicotine exposure

It is known that the extent of desensitization of nAChRs depends on both the time of exposure and the concentration of the ligand. Higher nicotine concentrations, as well as longer exposure to nicotine even at low concentrations, both resulted in a more desensitized nicotine response (Fenster et al., 1997; Paradiso and Steinbach, 2003; Pidoplichko et al., 1997).

To achieve different degrees of desensitization, we performed experiments in which oocytes expressing neuronal $\alpha 4\beta 4$ nAChRs were superfused with different concentrations of nicotine: 100 nM (a concentration close to the nicotine EC_3), 500 nM (a concentration close to the nicotine EC_{40} [Fig. 1C], that corresponds approximately to the ACh EC_2 of human $\alpha 4\beta 4$ nAChRs [Chavez-Noriega et al., 1997]), and 2 μ M (a concentration close to the maximal response of nicotine). For each concentration, an oocyte was exposed to nicotine for different times (2, 5, 10, and 20 min) followed by addition of 100 μ M zinc for 2 min. The oocyte was then returned to the original nicotine concentration without zinc for other 2 min. The oocyte was exhaustively washed for 20 min with normal Ringer's solution between nicotine applications.

Fig. 2A shows 100 nM nicotine-activated currents for the shorter (2 min) and the longer (20 min) exposure times on the same

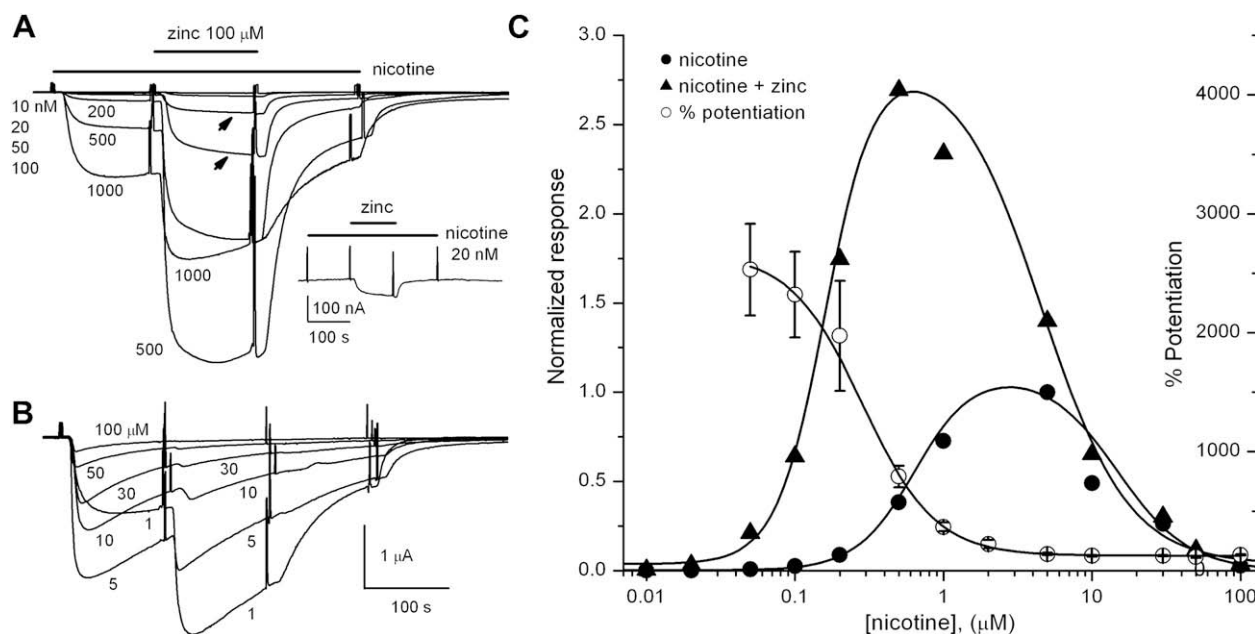


Fig. 1. Effects of zinc as a function of nicotine concentration. Representative superimposed currents elicited by low (A) and high (B) concentrations of nicotine in the presence of 100 μM zinc from oocytes expressing neuronal $\alpha 4\beta 4$ nAChRs. Numerals at left correspond to 10–100 nM nicotine in which almost no ion current was detectable; numerals close to each trace correspond to nicotine concentration (in nM, A and in μM , B). Arrows show the currents elicited by 50 and 100 nM nicotine and enhanced by zinc. Inset: rescaled record of the current activated by 20 nM nicotine and in the presence of zinc. (C) Nicotine concentration–response relationships for the control nicotine-activated current and for the nicotine-activated current in the presence of 100 μM zinc (filled circles and triangles, respectively; normalized to the maximal control current elicited by 5 μM nicotine, from a representative oocyte), and for the percent potentiation of the nicotine-activated current by zinc (open circles, the mean \pm standard error from 4 to 15 oocytes). Continuous lines correspond to the fitting of the data with the Hill equation. In this and subsequent figures the application time for nicotine and zinc is indicated by lower and upper lines above the records, respectively; they were also marked with 20 mV pulses to monitor membrane conductance. Unless otherwise stated, oocytes were maintained at a holding potential of -60 mV.

oocyte. Note that control nicotine responses did not decay during nicotine exposure. Zinc potentiation was $1392 \pm 222\%$, $n = 10$ for 2 min and $1103 \pm 515\%$, $n = 4$ for 20 min of nicotine exposure, which were not significantly different. For the 500 nM nicotine-activated current, zinc potentiation was $901 \pm 113\%$, $n = 7$ for 2 min and $813 \pm 53\%$, $n = 4$ for 20 min of nicotine exposure, data were not significantly different (Fig. 2B). Finally, Fig. 2C shows that the magnitude of the 2 μM nicotine-activated current decreased with subsequent applications of nicotine, and the responses also decayed faster than with lower nicotine concentrations, due to desensitization of a significant fraction of the receptors. Although the additional current in the presence of zinc was smaller when the oocyte was exposed to 2 μM nicotine for longer times, the potentiation of the nicotine-activated current by zinc was slightly high; however data were not significantly different. Thus, zinc potentiation was $220 \pm 32\%$, $n = 7$ for 2 min and $250 \pm 20\%$, $n = 4$ for 20 min of nicotine exposure.

From these data, it is evident that for the three concentrations of nicotine tested, the potentiation of the nicotine-activated current by zinc remained approximately constant as the time of nicotine exposure increased.

3.3. Effects of zinc during long exposure to nicotine

In the previous protocol, the long washing intervals (20 min) with Ringer's solution between nicotine applications may allow some recovery from desensitization. For this reason, oocytes expressing neuronal $\alpha 4\beta 4$ nAChRs were continuously exposed to nicotine for longer times (50 min) to obtain more desensitization. As before, the current was elicited by 100, 500 nM, or 2 μM nicotine. After 2 min with nicotine, 100 μM zinc was added for 2 min at 10 min intervals, in the continuous presence of nicotine.

Representative examples are illustrated for membrane currents elicited with 100 nM (Fig. 3A) and 2 μM (Fig. 3B) nicotine. Zinc potentiation of the 100 nM nicotine-activated current was $1315 \pm 193\%$, $n = 7$ and $505 \pm 74\%$, $n = 4$, after 2 and 48 min of continuous nicotine exposure, respectively; data were significantly different. Whereas zinc potentiation of the 2 μM nicotine-activated current was $249 \pm 48\%$, $n = 4$ and $110 \pm 55\%$, $n = 4$, after 2 and 48 min of continuous nicotine exposure, respectively; data were not significantly different.

Fig. 4 summarizes the data obtained by using the two protocols of long-time nicotine exposure. The first protocol involved intermittent applications of nicotine separated by 20-min washing periods (Fig. 2). The second protocol utilized continuous nicotine application (Fig. 3). In all the cases tested, potentiation of the nicotine-activated current by zinc decreased as the concentration of nicotine increased. However, potentiation by zinc did not change considerably as the time of nicotine exposure increased with intermittent applications of nicotine (Fig. 4A), whereas potentiation decreased as the time of nicotine exposure increased with continuous nicotine application (Fig. 4B). For example, in the former case, with 500 nM nicotine (a concentration reached by smoking a single cigarette), zinc potentiation remained approximately constant with longer times of nicotine exposure, $901 \pm 113\%$, $n = 7$ for 2 min and $813 \pm 53\%$, $n = 4$ for 20 min of nicotine exposure. In the latter case, the zinc potentiation significantly decreased from $721 \pm 80\%$, $n = 4$ for 2 min to $310 \pm 78\%$, $n = 4$ for 24 min of nicotine exposure ($P < 0.05$).

4. Discussion

The present study describes the potentiating effects of the divalent cation zinc on neuronal $\alpha 4\beta 4$ nicotinic acetylcholine

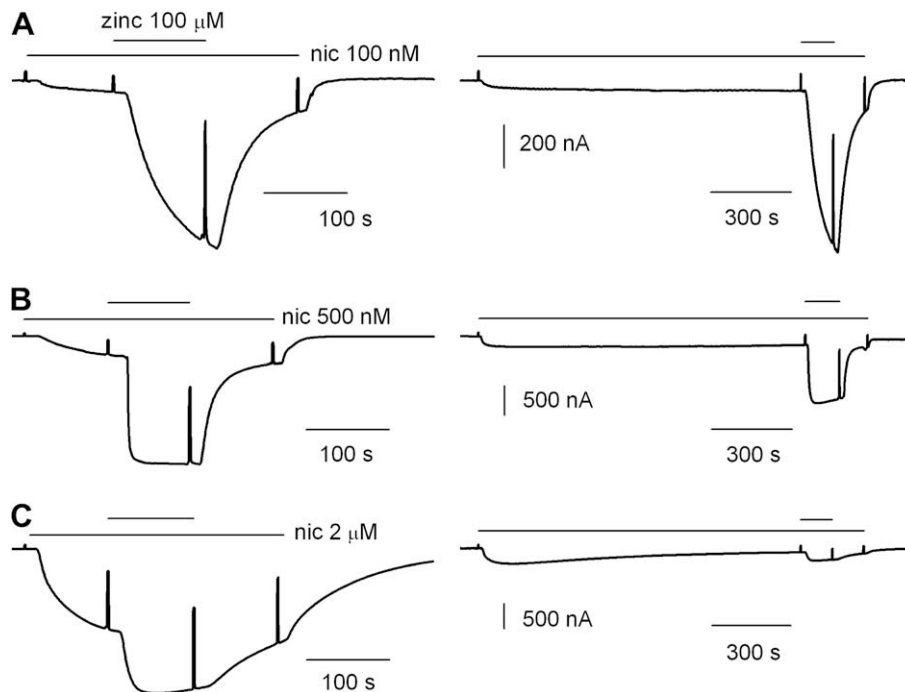


Fig. 2. Effects of zinc at different times of nicotine exposure. Ion currents elicited by 100 (A), 500 nM (B) and 2 μ M (C) nicotine for 2 min (records at left) and 20 min (records at right) from oocytes expressing neuronal α 4 β 4 nAChRs. An oocyte was exposed to one nicotine concentration for different times (2, 5, 10, and 20 min) followed by addition of 100 μ M zinc for 2 min. The oocyte was washed for 20 min with normal Ringer's solution between nicotine applications. Each pair of traces was recorded from the same oocyte. Representative experiments from $n = 4$ –7 oocytes.

receptors (nAChRs). In the majority of studies on the modulation of neuronal nAChRs by zinc, the receptors have been activated by ACh (García-Colunga et al., 2001, 2004; Hsiao et al., 2001, 2006, 2008; Moroni et al., 2008; Nutter and Adams, 1995; Palma et al., 1998). In the present study, α 4 β 4 nAChRs were activated by nicotine, an

exogenous agonist and the main addictive component of tobacco (Le Houezec, 2003; Lukas, 2007).

Interestingly, we found that 100 μ M zinc potentiated nAChRs even when they are activated with very low concentrations of nicotine (e.g. 20 nM), which are easily achieved in the human brain, since smoking only one cigarette generates a nicotine concentration close to 500 nM after 10–20 s (Henningfield et al., 1993; Le Houezec, 2003).

Zinc is more effective at potentiating nAChRs when they are activated by nicotine than by ACh. We found that 100 μ M zinc resulted in a maximal potentiation of a 50 nM nicotine-activated current to by nearly 25 times the control current. In contrast, when the current was elicited by ACh, maximal zinc potentiation was only approximately 5-fold with the same zinc concentration (Hsiao et al., 2001, 2006).

Additionally, most of the neuronal nAChRs, including the α 4 β 4 subtype, are more sensitive to nicotine than to ACh (Chavez-Noriega et al., 1997). Thus, for α 4 β 4 nAChRs the EC_{50} for nicotine is 5–11 μ M and for ACh is 19–74 μ M (Chavez-Noriega et al., 1997; Fenster et al., 1997; Hsiao et al., 2001, 2006). Furthermore, zinc increased the sensitivity of α 4 β 4 nAChRs for both ligands: the EC_{50} for ACh decreased in the presence of 50 μ M zinc from 74 to 23 μ M (Hsiao et al., 2001), whereas the EC_{50} for nicotine decreased in the presence of 100 μ M zinc from 639 to 160 nM (this study). It similarly occurs in α 4 β 2 nAChRs, in which 100 μ M zinc decreased the EC_{50} for ACh from 89 to 34 μ M (Moroni et al., 2008).

Although the precise roles of zinc in modulating nAChRs and in nicotine addiction are unknown, zinc potentiates the majority of neuronal nAChRs (Hsiao et al., 2001). This may occur even in situations in which very low concentrations of nicotine are used, such as in smoking people or in people treated with nicotine; in brain regions in which zinc is synaptically co-released with glutamate and nAChRs are expressed, such as the neocortex, pyriform cortex,

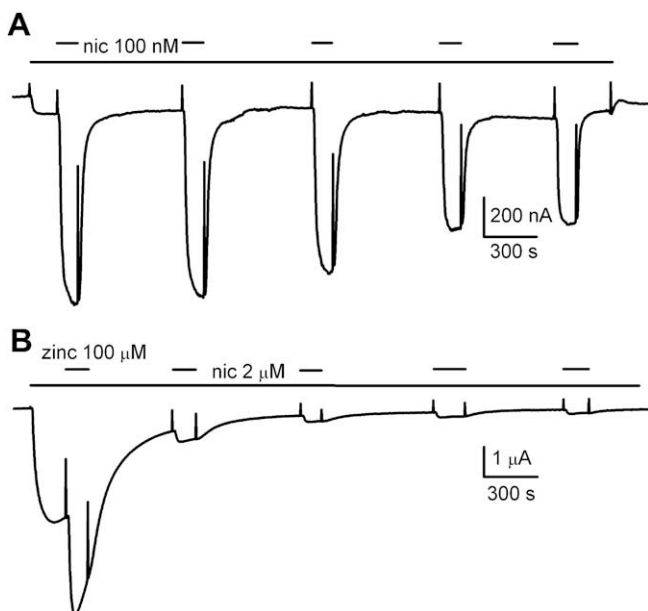


Fig. 3. Zinc effects during long nicotine exposure. Ion current elicited by 100 nM (A) and 2 μ M (B) nicotine during 50 min recorded from two different oocytes expressing neuronal α 4 β 4 nAChRs. Then, each 10 min, 100 μ M zinc was co-applied for 2 min. It is a representative experiment from $n = 4$ oocytes for each nicotine concentration.

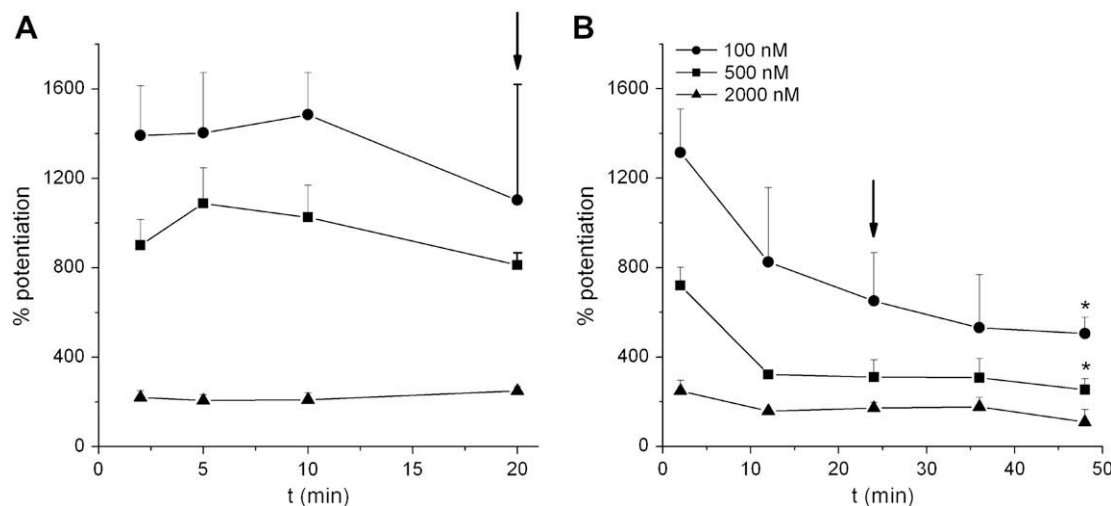


Fig. 4. Zinc effects during long nicotine exposure. Percent potentiation of the nicotine-activated current by zinc plotted as a function of the time of nicotine exposure, with 20 min washing intervals between nicotine applications (A) and during a continuous application of nicotine (B). Arrows indicate equivalent time of nicotine exposure. Results are given as mean \pm standard error. * $P < 0.05$ zinc potentiation after 48 min of continuous nicotine exposure compared to 2 min nicotine exposure at the same nicotine concentration, $n = 4-7$ experiments.

hippocampus, striatum, and amygdala (Dani and Bertrand, 2007; Danscher and Stoltenberg, 2005; Paoletti et al., 2009). Thus, zinc may reach presynaptic or nonsynaptic nAChRs (Lendvai and Vizi, 2008), greatly enhancing the nAChR response by increasing burst duration of individual ion-channel opening (Hsiao et al., 2008), and thereby enhancing the release of neurotransmitters.

The fact that zinc potentiation decreased as the concentration of ACh (Hsiao et al., 2001) or nicotine (present study) increased might suggest a competition between zinc and the agonist for the same sites. However, it was determined that glutamate 59 and histidine 162 on the rat $\alpha 4$ nAChR subunit are the molecular mediators for zinc to potentiate nAChR function, providing evidence against a competitive mechanism (Hsiao et al., 2006). Thus, an additional mechanism may exist in which the potentiating effects of zinc could depend on the extent of desensitization of the nicotine-activated response. It is known that at high concentrations of the agonist there is more complex functioning of the receptors: activation, desensitization, and an open channel block by the agonist itself (Katz and Thesleff, 1957; Maconochie and Steinbach, 1995).

At high concentrations of nicotine, zinc also increased the sensitivity of $\alpha 4\beta 4$ nAChRs to the agonist, decreasing the IC_{50} for nicotine from 14.7 μM in the absence of zinc, to 4.6 μM in the presence of 100 μM zinc. Furthermore, at this blocking concentration of nicotine (5 μM), zinc potentiation was lower ($140 \pm 12\%$) than that at low concentrations of nicotine (at 50 nM, $2530 \pm 385\%$).

With long-time exposure and low concentrations of nicotine (100 or 500 nM), zinc potentiation is different depending on whether nicotine is washed out between applications or if nicotine exposure is continuous. In the former case, zinc potentiation is maintained approximately constant as the time of nicotine exposure increased, perhaps due to recovery from desensitization. In contrast, with continuous exposure to nicotine, nAChRs cannot recover from desensitization and they exhibit a higher affinity for the agonist (Katz and Thesleff, 1957), the desensitized state of the receptor might modify the zinc-interacting sites, reducing their sensitivity for zinc and therefore reducing its potentiating effect.

Zinc and nicotine are closely related to a variety of brain pathologies, including schizophrenia, anxiety, major depression, Parkinson's and Alzheimer's diseases (Gotti et al., 2006; Levin et al.,

2006; Mocchegiani et al., 2005; Takeda et al., 2007). It is interesting to consider some situations in which these substances have been administered chronically. For instance, zinc administration increases the pool of synaptic zinc in the rat hippocampus (Szewczyk et al., 2006). On the other hand, it has been suggested that chronic administration of nicotine may improve Alzheimer's disease, depression, and smoking cessation (Le Huezec, 2003; Newhouse et al., 2001; Salín-Pascual et al., 1996).

In addition to the endogenous activation of nAChRs by ACh and their modulation by zinc, different situations may occur upon exposure to nicotine. Zinc modulation will depend on the subunit composition and stoichiometry of nAChRs, their regional localization in the CNS, cellular location of nAChRs, concentration of ACh and/or nicotine, zinc concentration, and the functional state of nAChRs, among others. Thus, it is of interest to take these substances into consideration to develop new clinically useful neuronal nAChRs ligands.

In conclusion, zinc potentiates neuronal nAChRs to an extent that depends on the concentration and time of exposition to nicotine. The potentiation is strong with low nicotine concentrations or brief nicotine exposure, whereas it is weak with high nicotine concentrations or long nicotine exposure, suggesting that modulation of nAChRs by zinc also depends on the extent of receptor desensitization.

Acknowledgements

We want to express our gratitude to Dr. Ricardo Miledi for initiating these experiments and for subsequent invaluable help during this work. We are grateful to Drs. J. Boulter and S. Heinemann (the Salk Institute) for providing the nicotinic acetylcholine receptor clones, to Martín García Servín for his assistance taking care of frogs and Leonor Casanova Rico for administrative support. We express our gratitude to Drs. Mauricio Díaz-Muñoz, Stefan Mihailescu and Dorothy Pless for critically reviewing the manuscript. This work was supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México 44015Q, 81911, and by a Grant from Dirección General de Asuntos del Personal Académico IN 212906-3 to J.G.C.; E.V.G. was supported by CONACyT and DGEP-UNAM fellowships while conducting PhD studies in PDCB-UNAM.

References

- Arias, H.R., Bhumireddy, P., Bouzat, C., 2006. Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38, 1254–1276.
- Chavez-Noriega, L.E., Crona, J.H., Washburn, M.S., Urrutia, A., Elliott, K.J., Johnson, E.C., 1997. 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.* 280, 346–356.
- Dani, J.A., Bertrand, D., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699–729.
- Danscher, G., Stoltenberg, M., 2005. Zinc-specific autometallographic in vivo selenium methods: tracing of zinc-enriched (ZEN) terminals, ZEN pathways, and pools of zinc ions in a multitude of other ZEN cells. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 141–153.
- Fenster, C.P., Rains, M.F., Noerager, B., Quick, M.W., Lester, R.A., 1997. Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J. Neurosci.* 17, 5747–5759.
- Frederickson, C.J., Koh, J.Y., Bush, A.I., 2005. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 449–462.
- Frederickson, C.J., Giblin III, L.J., Balaji, R.V., Masalha, R., Frederickson, C.J., Zeng, Y., Lopez, E.V., Koh, J.Y., Chorin, U., Besser, L., Hershinkel, M., Li, Y., Thompson, R.B., Krezel, A., 2006. Synaptic release of zinc from brain slices: factors governing release, imaging, and accurate calculation of concentration. *J. Neurosci. Methods* 154, 19–29.
- García-Colunga, J., González-Herrera, M., Miledi, R., 2001. Modulation of nicotinic acetylcholine receptors by zinc. *Neuroreport* 12, 147–150.
- García-Colunga, J., Vázquez-Gómez, E., Miledi, R., 2004. Combined actions of zinc and fluoxetine on nicotinic acetylcholine receptors. *Pharmacogenomics* 4, 388–393.
- Gotti, C., Zoli, M., Clementi, F., 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 482–491.
- Harrison, N.L., Gibbons, S.J., 1994. Zn^{2+} : an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* 33, 935–952.
- Harvey, R.J., Thomas, P., James, C.H., Wilderspin, A., Smart, T.G., 1999. Identification of an inhibitory Zn^{2+} binding site on the human glycine receptor $\alpha 1$ subunit. *J. Physiol.* 520, 53–64.
- Henningfield, J.E., Stapleton, J.M., Benowitz, N.L., Grayson, R.F., London, E.D., 1993. Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend.* 33, 23–29.
- Hsiao, B., Dweck, D., Luetje, C.W., 2001. Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J. Neurosci.* 21, 1848–1856.
- Hsiao, B., Mihalak, K.B., Magleby, K.L., Luetje, C.W., 2008. Zinc potentiates neuronal nicotinic receptors by increasing burst duration. *J. Neurophysiol.* 99, 999–1007.
- Hsiao, B., Mihalak, K.B., Repicky, S.E., Everhart, D., Mederos, A.H., Malhotra, A., Luetje, C.W., 2006. Determinants of zinc potentiation on the $\alpha 4$ subunit of neuronal nicotinic receptors. *Mol. Pharmacol.* 69, 27–36.
- Jensen, A.A., Frølund, B., Liljefors, T., Krogsgaard-Larsen, P., 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J. Med. Chem.* 48, 4705–4745.
- Katz, B., Thesleff, S., 1957. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* 29, 63–80.
- Le Houezec, J., 2003. Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7, 811–819.
- Le Novère, N., Corringer, P.J., Changeux, J.P., 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J. Neurobiol.* 53, 447–456.
- Lendvai, B., Vizi, E.S., 2008. Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. *Physiol. Rev.* 88, 333–349.
- Levin, E.D., McClernon, F.J., Rezvani, A.H., 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl.)* 184, 523–539.
- Lukas, R.J., 2007. Pharmacological effects of nicotine and nicotinic receptor subtype pharmacological profiles. In: George, T.P. (Ed.), *Medication Treatments for Nicotine Dependence*. Taylor & Francis Group, LLC; CRC Press, Boca Rata, FL, pp. 3–23.
- Maconochie, D.J., Steinbach, J.H., 1995. Block by acetylcholine of mouse muscle nicotinic receptors, stably expressed in fibroblasts. *J. Gen. Physiol.* 106, 113–147.
- Mocchegiani, E., Bertoni-Freddari, C., Marcellini, F., Malavolta, M., 2005. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. *Prog. Neurobiol.* 75, 367–390.
- Moroni, M., Vijayan, R., Carbone, A., Zwart, R., Biggin, P.C., Bermudez, I., 2008. Non-agonist-binding subunit interfaces confer distinct functional signatures to the alternate stoichiometries of the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor: an $\alpha 4$ – $\alpha 4$ interface is required for Zn^{2+} potentiation. *J. Neurosci.* 28, 6884–6894.
- Newhouse, P.A., Potter, A., Kelton, M., Corwin, J., 2001. Nicotinic treatment of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 49, 268–278.
- Nutter, T.J., Adams, D.J., 1995. Monovalent and divalent cation permeability and block of neuronal nicotinic receptor channels in rat parasympathetic ganglia. *J. Gen. Physiol.* 105, 701–723.
- Palma, E., Maggi, L., Miledi, R., Eusebi, F., 1998. Effects of Zn^{2+} on wild and mutant neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10246–10250.
- Paoletti, P., Ascher, P., Neyton, J., 1997. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1–NR2A receptors. *J. Neurosci.* 17, 5711–5725.
- Paoletti, P., Vergnano, A.M., Barbour, B., Casado, M., 2009. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158, 126–136.
- Paradiso, K.G., Steinbach, J.H., 2003. Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic receptors. *J. Physiol.* 553, 857–871.
- Pidoplichko, V.I., DeBiasi, M., Williams, J.T., Dani, J.A., 1997. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390, 401–404.
- Quik, M., Polonskaya, Y., Gillespie, A., Jakowec, M., Lloyd, G.K., Langston, J.W., 2000. Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.* 425, 58–69.
- Salín-Pascual, R.J., Rosas, M., Jimenez-Genchi, A., Rivera-Meza, B.L., Delgado-Parra, V., 1996. Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in nonsmoking patients with major depression. *J. Clin. Psychiatry* 57, 387–389.
- Sudweeks, S.N., Yakel, J.L., 2000. Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *J. Physiol.* 527, 515–528.
- Szewczyk, B., Sowa, M., Czupryn, A., Wierońska, J.M., Brański, P., Sadlik, K., Opoka, W., Piekoszewski, W., Smiałowska, M., Skangiel-Kramska, J., Pilc, A., Nowak, G., 2006. Increase in synaptic hippocampal zinc concentration following chronic but not acute zinc treatment in rats. *Brain Res.* 1090, 69–75.
- Takeda, A., Tamano, H., Kan, F., Itoh, H., Oku, N., 2007. Anxiety-like behavior of young rats after 2-week zinc deprivation. *Behav. Brain Res.* 177, 1–6.
- Zhang, J., Liu, Q., Chen, Q., Liu, N.Q., Li, F.L., Lu, Z.B., Qin, C., Zhu, H., Huang, Y.Y., He, W., Zhao, B.L., 2006. Nicotine attenuates β -amyloid-induced neurotoxicity by regulating metal homeostasis. *FASEB J.* 20, E399–E408.