

03097

1/12/02

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

ifil/0  
0  
0

Efecto de Inhibidores del Sistema de Recaptura de Monoaminas sobre los  
Receptores Nicotínicos de Acetilcolina

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

Héctor Eduardo<sup>1</sup>López Valdés

Asesor;

Dr. Ricardo Miledi y Dau

Campus UNAM-UAQ, Junquilla, Querétaro, enero de 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## AGRADECIMIENTOS

Por su ayuda en mi aprendizaje, a La Güera (Hilda), Paco, Chucho, Ricardo, Rogelio, Mauricio, Norma, Elizabeth, Lupita, Marina, Mónica y Carlos Calderón.

Por su apoyo y comprensión en los momentos de crisis y depresión provocados por esta tesis, a La Güera, mis hermanos y hermanas, Hortensia, Hilda (la tía), Malú, Hilda (La Negra), Javier, Paco, Mónica, Abraham, América, Ramón, Carlos Valverde, Tana, Maricela, Martha, Carlos Calderón, las vecinas (Pilar, Tere y Azucena), Alejandro, Tere Morales, Pavel y Alejandra.

Por su ayuda en la preparación de los cRNAs usados en este trabajo, a Marina Herrera González.

Por su apoyo bibliográfico, a María del Pilar Galarza Barrios.

Por sus valiosos comentarios sobre este trabajo, a Ricardo Miledi y Dau, Jesús García Colunga, Rogelio Arellano Ostoia, Mauricio Díaz Muñoz, Manuel Aguilar Ramírez, Estefan Mihailescu, Rafael Salín Pascual y Froylán Gómez Lagunas.

Por la corrección del manuscrito, a Mauricio López Valdés.

Por el apoyo económico, a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México, cuya beca me permitió realizar el doctorado.

*A María del Carmen Valdés de López  
y a Carlos Calderón Figueroa*

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas.</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.</b>	<b>6</b>
<b>Resumen.</b>	<b>8</b>
<b>Introducción.</b>	<b>11</b>
<b>Antecedentes</b>	
Depresión	13
Clasificación de antidepresivos.	17
Receptores nicotínicos de acetilcolina (R-nic).	21
Subtipos de R-nic.	24
Estructura molecular de los R-nic.	30
Estados funcionales de los R-nic.	40
Distribución y papel funcional de los R-nic.	42
Modulación de los R-nic por compuestos exógenos.	55
<b>Planteamiento del problema.</b>	<b>58</b>
<b>Hipótesis.</b>	<b>59</b>
<b>Objetivos.</b>	<b>59</b>
<b>Diseño experimental.</b>	<b>60</b>
<b>Materiales y métodos.</b>	<b>62</b>
<b>Resultados.</b>	<b>69</b>
<b>Discusión.</b>	<b>91</b>
<b>Conclusiones.</b>	<b>98</b>
<b>Anexo.</b>	<b>100</b>
<b>Bibliografía.</b>	<b>115</b>
<b>Apéndice. Artículo publicado.</b>	<b>127</b>

## ABREVIATURAS

AA.....	Aminoácidos.
AcCo.....	Acetilcolina.
A <sub>i</sub> .....	Amplitud del componente lento.
A <sub>r</sub> .....	Amplitud del componente rápido.
5-HT.....	Serotonina o 5~hidroxitriptamina.
DA.....	Dopamina.
Da.....	Daltones.
D <sub>f</sub> .....	Fracción de la corriente que disminuyó al final de la aplicación del compuesto, con respecto a la corriente máxima.
DPC.....	Dietylpirocarbonato.
I-AcCo.....	Corriente inducida por acetilcolina.
INC.....	Inhibidores no competitivos.
lo.....	Componente asintótico.
ISRM.....	Inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas.
ISRS.....	Inhibidores del sistema de recaptura de serotonina.
MAO.....	Monoaminoxidasa.
mV.....	miliVolts.
mM.....	milimolar.
μA.....	micro Amperios.
μM.....	micromolar.
nA.....	nanoAmperios.
NA.....	Noradrenalina.
nM.....	nanomolar.
pA.....	pico Amperios.
pS.....	picoSiemens.
R-nic.....	Receptores nicotínicos.
SNC.....	Sistema nervioso central.
SNP.....	Sistema nervioso periférico.
τ <sub>l</sub> .....	Constante de tiempo lenta.
τ <sub>r</sub> .....	Constante de tiempo rápida.
V <sub>m</sub> .....	voltaje de membrana.

*j*

## ABSTRACT

This study was made to evaluate the effects of several monoamine-uptake inhibitors (ISRM) on membrane currents elicited by acetylcholine (I-AcCo) generated by rat neuronal  $\alpha_2/34$ , mouse muscle and *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptors (R-nic) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. For the three subtypes of receptors the ISRM reduced the I-AcCo albeit to different degrees. The order of inhibitory was norfluoxetine > clomipramine > indatraline > fluoxetine > imipramine > zimelidine > 6-nitro-quipazine > trazodone for neuronal  $\alpha_2p4$ , norfluoxetine > fluoxetine > imipramine > clomipramine > indatraline > zimelidine > trazodone > 6-nitro-quipazine for mouse muscle and imipramine > fluoxetine > clomipramine > indatraline > zimelidine > 6-nitro-quipazine > trazodone for *Torpedo*. Thus, the most potent inhibitors were norfluoxetine (neuronal  $\alpha_2(34$  and mouse muscle) and imipramine (*Torpedo*) whilst the weakest ones were trazodone, 6-nitro-quipazine and zimelidine. Effects of imipramine and clomipramine were studied in more detail. Imipramine inhibited reversibly and non-competitively the I-AcCo with a different inhibiting potency for three R-nic subtypes. The half-inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of imipramine were  $3.65 \pm 0.30 \mu\text{M}$  for neuronal  $\alpha_2/34$ ,  $5.57 \pm 0.19 \mu\text{M}$  for mouse muscle and  $0.66 \pm 0.10 \mu\text{M}$  for *Torpedo*. The corresponding Hill coefficients (nH) were 0.73, 1.2 and 0.86 respectively. The inhibition of imipramine was slightly voltage-dependent,

with electric distances of  $\sim 0.10$  and  $\sim 0.12$  for neuronal  $\alpha 2\text{p}4$  and mouse muscle R-nic respectively. Moreover, imipramine accelerated the decay of I-AcCo of both muscle and neuronal  $\alpha 2\text{p}4$  receptors. The AcCo-current inhibition was stronger when oocytes, expressing neuronal  $\alpha 2(34$  and mouse muscle, were preincubated with imipramine alone than when it was coapplied with AcCo, suggesting that imipramine acts also on non-activated or closed R-nic. In the other hand, the effects of the clomipramine on I-AcCo only were studied in *Xenopus laevis* oocytes expressing neuronal  $\alpha 2\text{p}4$ . Clomipramine inhibited I-AcCo rapidly and reversibly, with a similar  $\text{IC}_{50}$  when oocytes were preincubated with clomipramine ( $1.26 \pm 0.23 \mu\text{M}$ ) or when they were coapplied with AcCo ( $1.53 \pm 0.32 \mu\text{M}$ ), the  $n\text{H}$  were 0.86 y 0.78 respectively. These results suggest that clomipramine interacts with R-nic at a single site and it is required that the channel is open. The inhibitory effect of clomipramine was weakly voltage-dependent with an electric distance of  $\sim 0.14$ . Moreover, clomipramine accelerated the decay of AcCo-currents. From all this, I conclude that ISRM tested here reduce I-AcCo, that imipramine regulates reversibly and non-competitively neuronal  $\alpha 2(34$  and mouse muscle through similar mechanisms, perhaps by interacting externally on a non-conducting state of the R-nic and by blocking the open receptor-channel complex close to the vestibule of the channel. Moreover, clomipramine reversibly and non-competitive regulates neuronal  $\alpha 2\text{p}4$  by blocking the open receptor channel complex at a site close to the extracellular vestibule of the channel. Finally, the electric distance for imipramine and clomipramine were similar, suggesting that both drugs interact at the same or closely related site of neuronal  $\alpha 2\text{p}4$  receptors.

## RESUMEN

Este estudio se realizó para evaluar los efectos de varios inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas (ISRM) sobre las corrientes de membrana inducidas por acetilcolina (I-AcCo) y generadas por los receptores nicotínicos (R-nic) neuronales  $\alpha 2(34$  de rata, musculares de ratón y del órgano eléctrico de la raya *Torpedo californica*, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. En los tres subtipos de R-nic, los ISRM reducen la I-AcCo en diferentes grados. El orden de inhibición fue: norfluoxetina > clorimipramina > indatralina > fluoxetina > imipramina > zimelidina > 6-nitro-quipazina > trazodona para los neuronales  $\alpha 2p4$ , norfluoxetina > fluoxetina > imipramina > clorimipramina > indatralina > zimelidina > trazodona > 6-nitro-quipazina para los musculares de ratón, e imipramina > fluoxetina > clorimipramina > indatralina > zimelidina > 6-nitro-quipazina > trazodona para los del órgano eléctrico del *Torpedo*. De esta forma, los inhibidores más potentes fueron la norfluoxetina (neuronales  $\alpha 2p4$  y musculares de ratón) y la imipramina (*Torpedo*), mientras los menos potentes fueron la trazodona, 6-nitro-quipazina y la zimelidina. Los efectos de la imipramina y de la clorimipramina se estudiaron con mayor detalle. La imipramina inhibe de forma no competitiva y reversiblemente la I-AcCo con una potencia de inhibición diferente en los distintos R-nic. La concentración de imipramina que inhibe la mitad de la respuesta máxima de AcCo ( $IC_{50}$ ) fue de  $3.65 \pm 0.30 \mu M$  para los neuronales  $\alpha 2p4$ ,  $5.57 \pm 0.19 \mu M$  para los musculares de ratón y  $0.66 \pm 0.10 \mu M$  para los

de *Torpedo*. El coeficiente de Hill (nH) fue de 0.73, 1.2 y 0.86 respectivamente, sugiriendo un sitio de unión de la imipramina con los diferentes R-nic. La inhibición de la imipramina fue ligeramente dependiente del voltaje, con una distancia eléctrica de  $\sim 0.10$  y  $\sim 0.12$  para los neuronales  $\alpha 2p4$  y musculares de ratón, respectivamente. Además, la imipramina acelera el decaimiento de la I-AcCo en ambos subtipos de receptores. La inhibición de la I-AcCo fue más potente en ambos receptores cuando los ovocitos fueron preincubados con imipramina sola, que cuando ésta se aplicó después de que la I-AcCo se generó, sugiriendo que la imipramina también actúa en R-nic no activados o cerrados. Por otra parte, se estudiaron los efectos de la clorimipramina sobre las I-AcCo en los R-nic neuronales  $\alpha 2p4$ . La clorimipramina inhibe la I-AcCo de forma no competitiva y reversiblemente, con una  $IC_{50}$  similar cuando los ovocitos fueron preincubados con clorimipramina ( $1.26 \pm 0.23 \mu M$ ) o cuando ésta fue coaplicada con AcCo ( $1.53 \pm 0.32 \mu M$ ), lo cual sugiere que la clorimipramina interactúa sólo cuando el canal está abierto. Los nH fueron 0.86 y 0.78, respectivamente, indicando que la clorimipramina interactúa con los R-nic neuronales  $\alpha 2p4$  en un solo sitio. El efecto inhibitorio de la clorimipramina fue ligeramente dependiente del voltaje con una distancia eléctrica de  $\sim 0.14$ . Además, la clorimipramina también acelera el decaimiento de la I-AcCo. Por todo esto, concluyo que los ISRM probados en este estudio reducen la I-AcCo; que la imipramina regula de forma reversible y no competitivamente a los R-nic neuronales  $\alpha 2p4$  y musculares de ratón a través de un mecanismo similar, por el cual bloquean el canal abierto del receptor en un sitio cercano al vestíbulo y quizás, también, al interactuar externamente en el receptor en estado cerrado o

no conductor. Además, la clorimipramina también regula reversible y no competitivamente a los R-nic neuronales  $\alpha 2\text{p}4$  al bloquear el complejo receptor-canal en estado abierto, en un sitio cercano al vestíbulo extracelular del canal. Finalmente, tanto la imipramina como la clorimipramina interactúan con los R-nic neuronales  $\alpha 2\text{p}4$  en el mismo sitio o en sitios muy cercanos.

## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) participa en un gran número de funciones, desde la regulación del medio interno hasta la integración de respuestas complejas a las condiciones del mundo que nos rodea. El correcto desarrollo de procesos mentales tan complejos como la percepción, el conocimiento, el juicio, etc., precisan necesariamente que eventos a nivel celular y molecular, como la transmisión sináptica, se lleven a cabo de un modo exacto y sincronizado, y se ha propuesto que algunos trastornos mentales pueden generarse por procesos químicos anómalos en las sinapsis neuronales.

Desde hace cuatro décadas, la búsqueda de las bases neurobiológicas de la depresión ha estado sustentada parcialmente en evidencias farmacológicas, es decir, en el mecanismo de acción de algunos medicamentos. En las neuronas del SNC, la mayoría de los fármacos antidepresivos tienen acción inhibitoria sobre el metabolismo o la recaptura de las monoaminas noradrenalina (NA) y serotonina (5-HT) y, en menor grado, en la dopamina (DA). Estos efectos agudos apoyaron fuertemente las diversas hipótesis bioquímicas que señalaban que la disminución de alguno de los neurotransmisores antedichos estaba íntimamente relacionada con la aparición de la depresión. Las hipótesis acerca de la etiología de la depresión han evolucionado, y en la actualidad se centran en alteraciones intracelulares y están vinculadas con los efectos crónicos de los antidepresivos. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos celulares

y moleculares exactos por los cuales estos fármacos producen sus efectos terapéuticos.

La mayoría de los antidepresivos que inhiben los sistemas de recaptura de monoaminas también inhiben diversos receptores a neurotransmisores, tales como los receptores histaminérgicos (H<sub>1</sub>), dopaminérgicos (D<sub>2</sub>), adrenérgicos (α<sub>1</sub>), serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>) y muscarínicos. Se ha propuesto que la interacción entre estos receptores y los antidepresivos pueden causar algunos efectos tanto terapéuticos como secundarios no deseables.

Por otra parte, la interacción de los antidepresivos que inhiben el sistema de recaptura de monoaminas con los receptores nicotínicos de acetilcolina, en particular los presentes en el sistema nervioso, ha sido muy poco estudiada. Ello se ha debido, por un lado, a que la caracterización de estos receptores es reciente y compleja, y por otro, a que su papel funcional apenas comienza a conocerse. Sin embargo, existen evidencias a favor de la participación de los receptores nicotínicos de acetilcolina en la depresión y de la interacción de algunos antidepresivos con receptores nicotínicos. En este trabajo se estudió el efecto de ocho inhibidores de la recaptura de monoaminas (trazodona, zimelidina, 6-nitro-quipazina, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina, clorimipramina e imipramina) sobre receptores nicotínicos de acetilcolina del órgano eléctrico de la raya *Torpedo californica*, de los subtipos muscular y neuronal α<sub>2</sub>β<sub>4</sub> expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Además, se realizaron experimentos más detallados para conocer el mecanismo de acción de la imipramina y la clorimipramina en estos receptores.

## ANTECEDENTES

### **Depresión**

Los trastornos del ánimo generalmente son conocidos como desórdenes afectivos o del ánimo, y debido a que presentan una serie de síntomas de naturaleza heterogénea, actualmente se les considera síndromes. Los desórdenes afectivos incluyen la depresión y la manía, las cuales son concebidas como polos opuestos en el espectro afectivo. Un enfermo puede padecer depresión (desorden unipolar) o manía, o bien, presentar ambos, en cuyo caso se le conoce como desorden bipolar [Stahl, 2000].

En el síndrome depresivo las manifestaciones clínicas más comunes son: el abatimiento persistente del ánimo; trastornos del apetito, que pueden resultar en pérdida o ganancia de peso corporal; trastornos de sueño (insomnio o hipersomnia); trastornos psicomotores (hiperquinesia o bradicinesia); fatiga y pérdida de la energía; pérdida de la capacidad de atención; apatía y pérdida de interés hacia toda actividad; sentimientos de autodevaluación personal y frecuentemente un componente de angustia severa y síntomas tales como temores irracionales, hipocondriasis, pensamientos obsesivos e ideación suicida [Gelder *et al*, 1996; Salín Pascual, 1997; De la Fuente, 1998].

Los desórdenes afectivos han sido clasificados en muy diversas formas. Sin embargo, las clasificaciones más aceptadas son aquellas propuestas por la American Psychiatric Association en su *Diagnostic and Statistical Manual of*

*Mental Disorders* (4<sup>a</sup> ed, conocida como DSM-IV) y por la publicación editada por un comité internacional, *The International Classification of Disease* (10<sup>a</sup> ed., conocida como ICD-10) [Gelder *et al*, 1996; Stahl, 2000]. En tales clasificaciones el síndrome depresivo es subdividido de acuerdo con criterios de utilidad clínica, como la severidad, si presenta o no manía, u otros síntomas psiquiátricos, como neurosis, etc. Para los propósitos de este trabajo se utilizará simplemente el término *depresión* para denotar al síndrome de desorden depresivo.

A través del tiempo, ha habido diferentes aproximaciones para conocer la etiología de la depresión, entre las que se incluyen factores genéticos, ambientales y neurobiológicos. Sin embargo, todavía no se identifica plenamente la o las causas de este trastorno [Gelder *et al.*, 1996; Stahl, 2000].

La primera hipótesis acerca de la etiología neurobiológica de la depresión, "la hipótesis de las catecolaminas", propuesta por Schildkraut y por Bunney y Davis en 1965 (Vetulani y Nalepa, 2000), afirmaba que al menos algunas formas de depresión se asociaban con una reducción en la disponibilidad de catecolaminas, principalmente noradrenalina (NA), y que la manía se relacionaba con el aumento de ésta [Salín Pascual, 1997; De la Fuente, 1998].

Las evidencias en que se apoya esta hipótesis son farmacológicas, y consisten en la observación de que ciertos fármacos (metildopa y reserpina) que disminuyen los niveles de NA pueden inducir depresión en algunas personas. Además, los antidepresivos conocidos en esa época (tricíclicos e inhibidores de la enzima monoaminoxidasa, MAO) tenían efectos farmacológicos que estimulaban el aumento de ese neurotransmisor. Así, la idea central de esta hipótesis es que la cantidad "normal" del neurotransmisor

se encuentra disminuida por un proceso desconocido, y que tal disminución conduce a la depresión [Stahl, 2000].

Por otra parte, la cuantificación de catabolitos de NA también proporciona evidencias a favor de esta hipótesis. Los niveles de 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol, el principal catabolito de NA en el líquido cefalorraquídeo, son menores en algunos pacientes deprimidos con respecto a individuos sanos [Salín Pascual, 1997; De la Fuente, 1998],

Posteriormente, diversos grupos de investigadores proporcionaron evidencias de que la deficiencia de 5-HT también participaba de forma importante en la etiología de la depresión. En 1974, Prange propuso la hipótesis "Permisiva de las Aminas Biogénicas del desorden Afectivo", la cual sugiere que una deficiencia en la transmisión de 5-HT permite el desorden afectivo, pero no lo causa. De tal manera que si existe un aumento en la transmisión de catecolaminas y una disminución en la de 5-HT, el paciente exhibe manía. En contraste, si disminuye la transmisión de catecolaminas y la 5-HT, entonces el paciente presenta depresión [De la Fuente, 1998].

Las principales evidencias que apoyan esta hipótesis son: existe una disminución de la disponibilidad de triptofano cerebral, un precursor de la 5-HT; el ácido 5-hidroxiindoloacético, principal catabolito de la 5-HT está disminuido en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes depresivos; en estudios *post mortem* de pacientes deprimidos, el hallazgo más constante es un aumento en el número de receptores 5-HT<sub>2</sub> corticales [Salín Pascual, 1997; De la Fuente, 1998].

Además de NA y 5-HT, otros neurotransmisores han sido relacionados con la depresión. Las evidencias que apoyan la participación de la DA consisten en el hecho de que algunos pacientes deprimidos se benefician con

la aplicación del precursor dopaminérgico l-dopa, y que el catabolito de la DA, el ácido homovainílico, se encuentra disminuido [Salín Pascual, 1997; De la Fuente, 1998].

En 1972, Janowsky y colaboradores propusieron que también el sistema colinérgico está alterado en la depresión; ellos se basan en el hecho de que los agentes estimulantes de la actividad colinérgica muscarínica en el SNC, como la fisostigmina y la arecolina, pueden inducir un estado depresivo [Salín Pascual, 1997].

Las deficiencias de neurotransmisores o de sus metabolitos como factores causales de la depresión han sido ampliamente estudiadas, y los resultados son confusos. Algunas investigaciones sugieren que los metabolitos de NA y 5-HT están anormalmente disminuidos en algunos pacientes deprimidos, pero en otros estudios esta observación no es constante [Stahl, 2000].

En cuanto al efecto de los antidepresivos, existe un desfase temporal muy grande entre los efectos sinápticos agudos de estos compuestos y el inicio de los efectos terapéuticos. Los antidepresivos estimulan de forma inmediata el incremento de las monoaminas en las sinapsis, en tanto sus acciones terapéuticas ocurren generalmente después de semanas de tratamiento, por lo que se ha sugerido que los efectos agudos no son el principal efecto terapéutico de dichos compuestos [Stahl, 2000].

Recientemente se ha propuesto que la depresión puede deberse a una deficiencia en los mecanismos de transducción de las señales de monoaminas en las neuronas postsinápticas. Esta hipótesis propone que en las neuronas postsinápticas a monoaminas existen deficiencias en la expresión del gen que codifica para el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro, o BDNF [Duman *et al*, 1997; Stahl, 2000; Duman *et al*., 2000; Reid y Stewart, 2001].

En condiciones normales, el BDNF tiene efectos protectores sobre las neuronas, pero en condiciones de estrés el gen para BDNF se encuentra reprimido, por lo que se cree que las neuronas susceptibles se atrofian en sitios como el hipocampo, y posiblemente sufran apoptosis, lo que a su vez conduce a la depresión. Existen evidencias en pacientes deprimidos que muestran una disminución en el tamaño de estructuras relevantes para los estados de ánimo, como el hipocampo y la corteza prefrontal. Además, esta hipótesis también se apoya en los efectos de los antidepresivos, ya que se ha mostrado que diversos antidepresivos activan el gen de BDNF, y se cree que de esta forma ejercen sus efectos terapéuticos [Duman *et al.*, 1997; Stahl, 2000; Duman *et al.*, 2000; ReidyStewart,2001].

### **Clasificación de los antidepresivos**

Con el advenimiento de los medicamentos antidepresivos desde finales de la década de los cincuentas, y la constante aparición de nuevos fármacos, la depresión es un problema médico que puede tratarse con diversos fármacos. Sin embargo, a pesar de la intensa investigación, en la actualidad no se dispone de una explicación adecuada y completa del mecanismo de acción de los antidepresivos [Moreno *et al.*, 1999; Stahl, 2000].

Los antidepresivos disponibles presentan diferentes estructuras químicas y propiedades farmacológicas, y a través del tiempo han sido clasificados con criterios estructurales, farmacológicos y mixtos, si bien el criterio farmacológico es cada vez más frecuente. Existen diversas clasificaciones

sustentadas en sus efectos farmacológicos. En las Tablas 1 y 2 se muestran, a manera de ejemplo, dos propuestas de clasificación.

Es importante resaltar que, independientemente de su clasificación, en términos muy generales los antidepresivos se pueden agrupar en:

A) Aquellos que inhiben la actividad de los sistemas de recaptura de monoaminas (ISRM). Estos sistemas son el principal mecanismo para la remoción de los neurotransmisores monoaminas. Están constituidos por una proteína con doce segmentos transmembranales que tienen actividad de cotransportadores (junto con  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) y que unen con alta afinidad a uno de los neurotransmisores, NA, 5-HT o DA. Estos cotransportadores se localizan principalmente en la membrana celular de las neuronas presinápticas. Los fármacos que inhiben la actividad de estos sistemas, al parecer, presentan un mecanismo alostérico [Hoffman *et al.*, 1998; Stahl, 2000].

B) Fármacos que inhiben la actividad de cualquiera de las isoformas (A o B) de la enzima MAO, presente en las mitocondrias de las neuronas presinápticas. Una vez que los neurotransmisores monoaminas han sido recapturados (ingresados) a la neurona que los secretó, éstos son metabolizados por la MAO. La isoforma MAO<sub>A</sub> metaboliza principalmente 5-HT y NA, en tanto la isoforma MAO<sub>B</sub> principalmente a la DA [Salín Pascual, 1997; Stahl, 2000].

C) Finalmente, existen algunos compuestos que inhiben con mayor selectividad al receptor  $\alpha_2$  presináptico en neuronas adrenérgicas (autorreceptor) o serotoninérgicas (heterorreceptor) [Richelson, 1999].

Por otra parte, la mayoría de los fármacos que bloquean los sistemas de recaptura de monoaminas presentan antagonismo en receptores hacia diversos neurotransmisores, como histaminérgicos (H<sub>1</sub>), dopaminérgicos (D<sub>2</sub>), adrenérgicos (α<sub>1</sub>), serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>, 2C) muscarínicos y nicotínicos [Richelson y Nelson, 1984; Cusack *et al*, 1994; Richelson, 1994; 1996; 1999; Owens *et al*, 1997; Ni y Miledi, 1997; García-Colunga *et al*, 1997a; Maggi *et al*, 1998; Moreno *et al*, 1999; Stahl, 2000].

**Tabla 1. Clasificación de los antidepresivos.**

Tipo de actividad	Fármaco	Efecto sináptico
Inhibidores de MAO	Fenelzina	—
Inhibidores del Transporte de neurotransmisores	bupropión	Bloqueo del transporte de DA
	citalopram	
	clorimipramina	Bloqueo del transporte de 5-HT
	fluoxetina	
	fluvoxamina	
	imipramina	
	paroxetina	
	sertralina	
	venlafaxina	
	desimipramina	
nortriptilina		
protriptilina		
Inhibidores de receptores a neurotransmisores	amitriptilina	Bloqueo de receptores histamina(H <sub>1</sub> )
	doxepina	
	maprotilina	
	mirtazapina	
	trimipramina	Bloqueo de receptores 5-HT <sub>2A</sub>
	amoxapiña	
	nefazadona	
	trazodona	

Datos tomados de Richelson, 1999.

**Tabla 2. Clasificación de los antidepresivos.**

<p>1) Inhibidores del sistema de recaptura de NA.</p> <p>desimipramina nortriptilina protriptilina maprotilina</p>	<p>2) Inhibidores del sistema de recaptura de DA.</p> <p>bupropión</p>
<p>3) Inhibidores selectivos del sistema de recaptura de 5-HT (ISRS).</p> <p>fluoxetina paroxetina sertralina citalopram fluvoxamina</p>	<p>4) Activadores del sistema de recaptura de 5-HT.</p> <p>tianeptina</p>
<p>5) Inhibidores mixtos de los sistemas de recaptura de NA y 5-HT.</p> <p>imipramina doxepina amitriptilina trimipramina nenlafaxina lefropramina</p>	<p>6) Inhibidores de las monoaminooxidasas (IMAO).</p> <p>isocarboxacida tranilcipromida fenelcina brofaromina moclobemida blefoxatona</p>
<p>7) Agentes liberadores de monoaminas.</p> <p>dextroanfetaminas metilfenodato pemolina mirtazapina</p>	<p>8) Agonistas de receptores de neurotransmisores.</p> <p>Agonistas parciales de 5-HT<sub>1A</sub></p> <p>buspirona gespirona</p>
<p>9) Agonistas de receptores de benzodiacepinas</p> <p>alprazolam</p>	<p>10) Fármacos con acción mixta.</p> <p>nefazadona trazodona amoxapina clorimipramina</p>

Datos tomados de Salín Pascual, 1997.

## Receptores nicotínicos de acetilcolina

La acetilcolina (AcCo) es una molécula de 178 daltones (Da) de peso molecular, que activa a dos tipos de receptores radicalmente distintos. Ambos tipos difieren en su estructura química así como en sus propiedades farmacológicas y fisiológicas. Unos son denominados nicotínicos (R-nic), y los otros, muscarínicos, debido a que la nicotina y la muscarina funcionan como agonistas específicos de unos y otros respectivamente. Los R-nic son proteínas formadas por cinco subunidades con un canal iónico constitutivo, por el cual fluyen hacia el interior celular iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ , y salen iones de  $\text{K}^+$ , mientras que los muscarínicos son proteínas de una sola cadena polipeptídica acoplada a proteínas G [Barrantes, 1996].

Los R-nic, junto con los receptores del ácido y aminobutírico ( $\text{GABA}_A$ ) c) de glicina, de serotonina ( $5\text{-TH}_3$ ) y un subtipo de glutamato (aniónico) identificado en invertebrados, pertenecen a una familia génica (nicotinoides) de canales iónicos de compuerta activados por ligando, también llamados receptores ionotrópicos. Todos estos receptores tienen una estructura y un funcionamiento similar [Arias, 1998; Corringer *et al.*, 2000; Le Novère y Changeux, 2001] (ver Fig. 1).

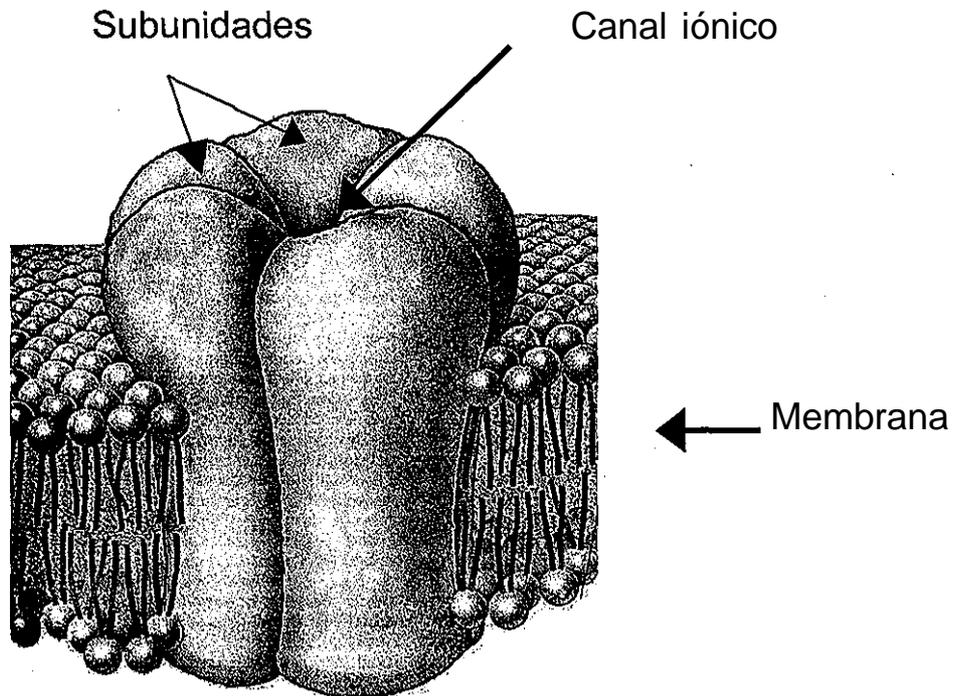


Figura 1. **Estructura general de los receptores ionotrópicos pertenecientes a la familia de los nicotinoides.** Los miembros de esta familia (R-nic, GABA<sub>A</sub><sub>Cl</sub> de glicina, 5-TH<sub>3</sub> y un subtipo de glutamato (aniónico), identificado en invertebrados) están formados por cinco subunidades y presentan un canal iónico intrínseco. Modificada de Changeux, 1994.

Estructuralmente, todos los miembros de esta familia comparten las siguientes características: a) cada receptor es un oligómero formado por cinco subunidades; b) con base en el análisis de hidrofobicidad (índice hidropático) se ha sugerido que los receptores presentan tres dominios bien diferenciados: extracelular hidrofílico, transmembranal hidrofóbico e intracelular hidrofílico; c) cada subunidad atraviesa la membrana lipídica formando cuatro dominios transmembranales denominados M1-M4. Los aminoácidos (AA) que forman el dominio M2 de cada subunidad forman la pared del canal iónico; d) el dominio intracelular está formado por un asa grande constituida por AA de



unir neurotransmisores específicos; 2) la unión del ligando abre el canal iónico intrínseco asociado con cada receptor particular; 3) después de que el canal se ha abierto, se produce un flujo selectivo de iones que son conducidos a través de la membrana celular y, finalmente, 4) en presencia prolongada del agonista, los receptores se desensibilizan, y en tal estado de conformación el canal no conduce iones [Arias, 1998].

### **Subtipos de R-nic**

El R-nic presente en el órgano eléctrico de las rayas *Torpedo (californica y marmota)* es el receptor activado por ligando mejor conocido. Fue el primero en ser purificado, reconstituido, registrado electrofisiológicamente al nivel de canal unitario, clonado y visualizado. Posteriormente, el uso del cADN de las subunidades de este R-nic, permitió la identificación de todo un grupo de genes en el sistema nervioso de vertebrados. En aves y mamíferos se han identificado un total de diecisiete subunidades proteicas, que son codificadas por diferentes genes. Cinco en el músculo estriado esquelético y doce en el sistema nervioso [Lindstrom, 1999; Le Novère y Changeux, 2001].

El nombre de las subunidades que forman los R-nic del órgano eléctrico y del músculo esquelético de vertebrados en la etapa fetal, antes de formarse la unión neuromuscular (subtipo muscular fetal), fue asignado conforme a sus masas moleculares, de la siguiente forma: 40 (a), 50 (P), 60 (y) y 65 (5) Kda. Después de que el músculo se ha innervado, ocurre la sustitución de la subunidad y, por otra llamada s. A este receptor comúnmente se le denomina muscular adulto. Dado que dichas subunidades fueron las primeras en ser caracterizadas, esta nomenclatura sigue vigente, excepto que las subunidades

a y (3 son ahora nombradas como al y (31 [Arias, 1998; Lindstrom, 1999; Corringier *et al*, 2000; Taylor *et al*, 2000].

La nomenclatura actual de las subunidades localizadas en el sistema nervioso (subtipo neuronal) se basa en la presencia o ausencia de un par de cisternas adyacentes, homologas a las presentes en las posiciones 192 y 193 en la subunidad al del R-nic del *Torpedo* y muscular. De acuerdo con este criterio, las subunidades que poseen ese par de cisternas adyacentes son denominadas subunidades a (a2-alO), y aquellas que no las presentan, se denominan P ((32~p4). El número de la subunidad refleja el orden temporal en el que fueron clonadas [Arias, 1998; Lindstrom, 1999 y 2000; Corringier *et al*., 2000 Le Novère y changeux, 2001].

Por su parte, los receptores han sido clasificados de acuerdo con las subunidades que los componen y según su distribución en el organismo, de lo que resultan dos grandes grupos. 1) Los R-nic musculares, también conocidos como periféricos, están compuestos por dos al y una de (31, y y 8. Se localizan de forma difusa en el tejido muscular de embriones de aves y mamíferos, en los órganos eléctricos de las rayas y las anguilas eléctricas. En la unión neuromuscular de aves y mamíferos están formados por dos al y una de (31, 5 y e. 2) los R-nic del subtipo neuronal, al parecer, también están constituidos, en sistemas de expresión heterólogos, por cinco subunidades, producto de la combinación de subunidades a (a2-a6) y (3 (p2-p4), formados sólo por cinco subunidades a idénticas (a7-a9), o bien por subunidades a diferentes (a9a 10) [Lindstrom, 1999; Paterson y Nordberg, 2000; Changeux y Edelstein,2001].

Otra clasificación considera la secuencia de AA de las subunidades, que forman receptores funcionales en sistemas de expresión heterólogos, y sus propiedades de unión con la  $\alpha$ -bungarotoxina. Con este criterio, los R-nic se pueden dividir en tres grupos: el primero está formado por los de *Torpedo* y musculares (fetal y adulto); el segundo, por receptores del subtipo neuronal formados por la combinación de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 6$ ) y  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ), y el tercero, por homómeros de  $\alpha 7$ - $\alpha 9$  [Clementi *et al.*, 2000].

Los R-nic de *Torpedo*, musculares y los neuronales  $\alpha 7$ - $\alpha 9$  presentan una unión competitiva e irreversible de alta afinidad (concentraciones  $< nM$ ) con la  $\alpha$ -bungarotoxina, toxina presente en el veneno de la serpiente taiwanesa *Bungurus multicinctus*, mientras que en los formados por la combinación de subunidades  $\alpha 2$ - $\alpha 6$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$  la toxina no se une [Prince y Sine, 1998; Clementi *et al.*, 2000].

Es importante resaltar que, mientras el papel funcional, las características estructurales y funcionales de los R-nic del subtipo muscular están bien caracterizadas *in vivo*, los del subtipo neuronal están menos caracterizados. Algunas de las razones de esto son: los órganos eléctricos son una fuente concentrada de grandes cantidades de R-nic de un solo subtipo; en mamíferos únicamente hay dos subtipos de estos receptores, fetal y adulto, los cuales difieren en la sustitución de una sola subunidad; la unión neuromuscular provee una preparación homogénea y fácilmente accesible para estudios electrofisiológicos, histológicos y de desarrollo, con lo que el papel funcional del R-nic adulto en la transmisión neuromuscular está bien entendida. En contraste, los R-nic neuronales son encontrados en bajas concentraciones en los tejidos y contienen varios subtipos de receptores, cada uno compuesto por

diferentes subunidades. El papel funcional de estos R-nic es muy diverso y en algunos casos desconocido; además, ellos pueden localizarse en la pre-, post-, para- y extrasinapsis, e incluso en sitios en tejido no nervioso [Lindstrom, 2000].

En los R-nic neuronales, la mayor parte de la información funcional ha sido obtenida *in vitro*, a partir de su expresión en sistemas heterólogos, principalmente en el ovocito de la rana *Xenopus laevis* y, en menor grado, en líneas celulares [Lukas, 1998; Picciotto *et al.*, 2000; Paterson y Nordberg, 2000; Zoli, 2000].

Los R-nic expresados en sistemas de expresión heterólogos presentan distintos perfiles fisiológicos y farmacológicos (ver adelante). En las Tablas 3 y 4 se muestran, a manera de ejemplo, algunas de las combinaciones de las subunidades que forman receptores funcionales y algunas propiedades farmacológicas.

Tabla 3. Composición de subunidades de receptores funcionales expresadas en sistemas de expresión heterólogo.

Muscular	Neuronales				
al piyS (fetal)	a 7	a9 a10	a2p2	a3[32a 5	a4a5[32f34
al pisS (adulto)	a 8		a2p4	a4a5p 2	
	a 9		a3p2		
			a3(34		
			a4(32		
			a4 34		

En estos sistemas, la inyección individual de las subunidades a2, a3, a4, a5, a6 y p2, p3 o p4 no expresan receptores funcionales. La subunidad a5 produce un receptor funcional cuando es coexpresado con las subunidades a4 y (32. Las subunidades a7, a8 y a9 sólo forman receptores homopentaméricos funcionales. Cuando estas subunidades se han coexpresado con cualquiera de las otras subunidades a o p no se forman receptores funcionales. (Datos tomados de Paterson y Nordberg, 2000; Changeux y Edelstein, 2001.) Sin embargo, cuando se coinyectaron la subunidad a7 con una mutación de una leucina por treonina en la posición 247 con la subunidad [33, las propiedades del R-nic a7 se modificaron, por lo que se cree que estas modificaciones son debidas a la participación de la subunidad p3 en el receptor [Palma *et al.*, 1999].

**Tabla 4. Algunas características farmacológicas y permeabilidad relativa del Ca<sup>2+</sup> en R-nic.**

Estructura	a2 P2	a2p4	a3p2	a3p4	ct4p2	a4p4	a7
Potencia Agonistas	D>N>C>A	N>D>O A	D>C>N>A	D>C>N>A	C>N>D>A	ON>D>A	D>C>N>A
Eficacia de Agonistas	A>N>D>C	A>N>D>C	D>A>N>C	A>D>N>C	A>N>D>C	A>N>C>D	N>A>O>D
Antagonista	d-T=DPE	d-T-DpE	d-T-DpE	d-T>DpE	DPE>d-T	DpE>d-T	DpE>d-T
P <sub>Ca<sup>2+</sup></sub> /P <sub>NA<sup>+</sup></sub>	1-15	1-1.5	-----	1.1.	-----	1-1.5	>15

P<sub>Ca<sup>2+</sup></sub>/P<sub>NA<sup>+</sup></sub> denota la tasa de permeabilidad relativa del Ca<sup>2+</sup> con respecto a la del Na<sup>+</sup>. Las abreviaturas son: A=acetilcolina; C=cistina; D=dimetilpiperazina; N=nicotina; d-T=d-tubocurarina; D/3E=dihidro-p-eritroidina. Datos tomados de Mihailescu y Drucker-Colín, 2000.

Aunque la mayoría de la información acerca de las características de los diferentes R-nic neuronales (perfil farmacológico, permeabilidad a Ca<sup>2+</sup>, decaimiento de la corriente, etc.) ha sido obtenido en sistemas de expresión heterólogos, algunos de los subtipos de receptores que son funcionales en neuronas de algunas regiones particulares del sistema nervioso, han sido identificados utilizando los datos obtenidos en dichos sistemas junto con otras técnicas, como por ejemplo: el uso de oligonucleótidos antisentido, con lo cual se logra disminuir transitoriamente la expresión de subunidades específicas. Con esta técnica se identificaron dos subtipos funcionales de R-nic en los ganglios simpáticos de pollo, unos formados por subunidades  $\alpha 3$  y otros formados por *al* [Piccioto *et al.*, 2000; Paterson y Nordberg, 2000].

Otra metodología que se ha utilizado es la generación de ratones *Knock Out* para subunidades específicas. Esta técnica, combinada con electrofisiología y con farmacología, ha permitido identificar diferentes

subtipos de R-nic. Mediante dicha estrategia se demostró que la subunidad  $\beta 2$  forma parte de los R-nic que median la liberación de dopamina y GABA [Piccioto *et al.*, 2000; Paterson y Nordberg, 2000].

En la Tabla 5 se muestran algunas propiedades de los R-nic presentes en neuronas del hipocampo, que al parecer son las mejor caracterizadas en el SNC. Alkondon y colaboradores [1993; 1999], utilizando la técnica de pinzamiento en parche (Patch Clamp), la cinética del decaimiento de corriente y la sensibilidad a diferentes compuestos, describieron cuatro tipos de corrientes inducidas por la aplicación de 3 mM de AcCo: IA, IB, II y III, que al ser comparadas con las obtenidas en subtipos de R-nic particulares expresados en ovocitos les permitió proponer una composición probable para cada una de estas corrientes.

**Tabla 5. Subtipos funcionales de R-nic en hipocampo de rata.**

Tipo de corriente	Frecuencia relativa	Decaimiento de la corriente	Farmacología	Composición probable
<b>IA</b>	83%	Rápido	Sensible a MLA, a-BGT, K-BGT	<i>α1</i>
<b>IB</b>	10%	Rápido y lento	Sensible a MLA + DHpE	<i>α7</i> ; <i>α4β2</i>
<b>II</b>	5%	Lento	Sensible a DH(3E)	<i>α4β2</i>
<b>ni</b>	2%	Lento	Sensible a MLA	<i>α3β4</i>

Abreviaturas, DHpE, dihidro-p-eritroidina; MLA, metilafacetina; a-BGT, a-Bungarotoxina; K-BGT, K-Bungarotoxina. Concentraciones utilizadas: Tipo IA a-BGT (10 nM), K-BGT (10 nM) y MLA (1 nM). Tipo II: DH(3E) (10 nM) y MLA y a-BGT (100 nM). Tipo III: a-BGT, K-BGT y MLA (>100 nM). Tipo IB MLA: (1 nM) + DH(3E) (10 nM). Datos tomados de Alkondon *et al.*, [1993; 1999].

Como podrá observarse en lo anterior, aún existe dificultad para poder identificar con certeza todas las subunidades que conforman un receptor particular en la mayoría de las estructuras del SNC. Además, se sabe que una neurona puede expresar más de un subtipo de R-nic, y en diferentes especies

es posible encontrar subtipos distintos para una misma región del SNC [Lindstrom, 2000].

### **Estructura molecular de los R-nic**

En la actualidad se conoce la estructura primaria de todas las subunidades proteicas identificadas, tanto en los R-nic musculares como en los neuronales [Le Novère y Changeux, 2001]. Las subunidades están formadas por ~ 450-700 AA> y presentan una homología entre ellas de ~ 60% (rata); el dominio con mayor homología es el transmembranal. Además, la homología para una misma subunidad en diferentes especies (ratas, humanos y pollos) es de ~ 82-95% [Buisson *et al.*, 2000]. Sin embargo, la mayor parte del conocimiento acerca de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, proviene de las investigaciones realizadas esencialmente en los R-nic de tipo muscular, y en menor medida en el neuronal *al.* No obstante, Karlin y Akabas [1995] plantearon que la estructura general en todos los R-nic es muy semejante, debido a que el análisis de la estructura primaria de las subunidades muestra una alta homología y permite suponer la misma topología para todas. Esta propuesta ha sido apoyada con predicciones de las estructuras secundaria y terciaria, realizadas para 18 subunidades alineadas y representativas con programas computacionales [Corringer *et al.*, 2000].

El análisis de difracción de rayos x con una resolución de 9 Å del R-nic del órgano eléctrico de *Torpedo*, en presencia y ausencia de AcCo y la posterior construcción de imágenes digitales, aportó información básica acerca

de la forma tridimensional de los R-nic [Unwin, 1995, 2000]. En las imágenes se observa que las cinco subunidades presentan un arreglo cilíndrico casi simétrico alrededor de un poro central, un dominio extracelular más ancho y grande que el intracelular, y un dominio transmembranal estrecho. El arreglo de las cinco subunidades es:  $\alpha 1$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha 1$ ,  $\delta$ ,  $\beta 1$ , de lo que resulta una estequiometría de  $2\alpha\gamma 5\beta 1$  [Karlin y Akabas, 1995; Unwin, 1995, 2000; Arias, 1998; Prince y Sine, 1998; Lindstrom, 1999; 2000; Corringer *et al*, 2000] (ver Figura 3).

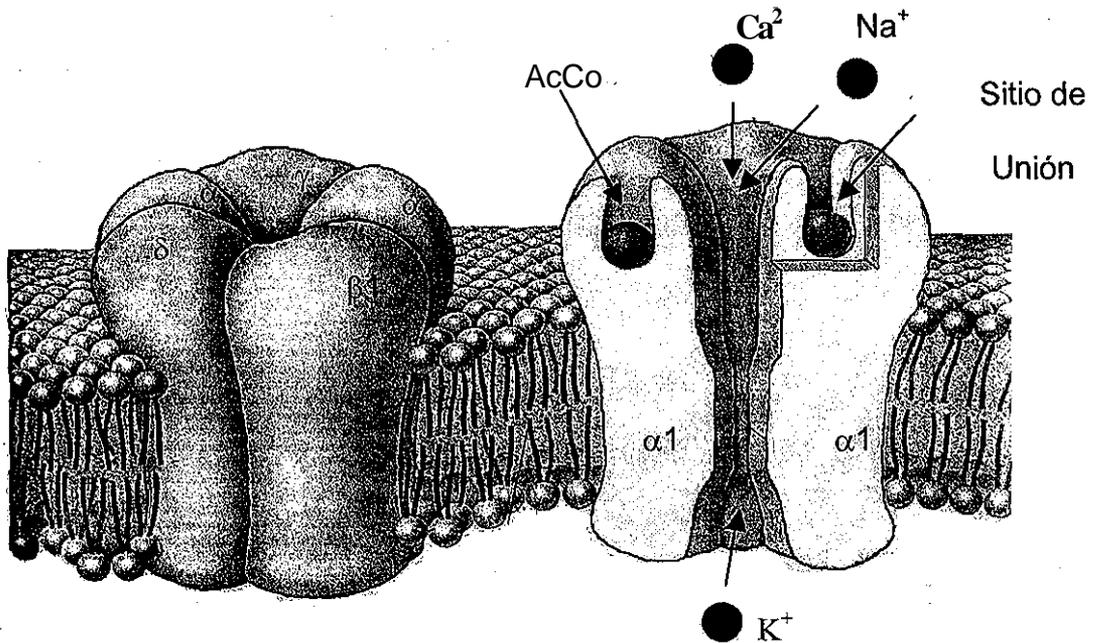


Figura 3. **Estructura general de los R-nic.** En esta figura se muestra el R-nic de *Torpedo* en estado de reposo (derecha) y cuando es activado por la AcCo (izquierda). Modificado de Changeux, 1994.

El dominio extracelular representa aproximadamente el 50% de la masa total de cada una de las subunidades y está formado por ~ 210 AA. Contiene las terminales amino y carboxilo, el asa que une los segmentos M2 con M3 y

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

los dos sitios de unión para la AcCo. En los R-nic musculares, los sitios de unión difieren en su afinidad. El sitio de alta afinidad se localiza en la interfase entre las subunidades al y la 5, mientras el de baja afinidad se encuentra en la interfase entre las subunidades al y la y (en adultos con la subunidad s) [Arias,1998; Prince y Sine, 1997].

Cada sitio de unión, a su vez, está conformado por dos regiones separadas. La primera tiene carga neta positiva y constituye el componente principal en la unión de la AcCo y está formada por tres asas (A, B y C.) de AA de la subunidad a1. La segunda región (complementaria) presenta carga neta negativa y está formada por AA de las subunidades 5, y y (o e), que forman cuatro asas denominadas 1, 2, 3 y 4. Se ha propuesto que el grupo cuaternario de amonio de la AcCo, cargado positivamente, interactúa con el sitio complementario con carga negativa, y el otro extremo de la molécula de la AcCo interactúa con el sitio principal [Prince y Sine, 1999],

En los R-nic neuronales heteropentaméricos, se ha propuesto que los dos sitios de unión de la AcCo están localizados en las interfases entre la subunidades a y (3. La región principal se localizaría en las subunidades a y la región complementaria en la subunidad (3 [Corringer *et al.*, 2000; Paterson y Nordberg, 2000].

Se cree que los R-nic homopentaméricos (al, a8 y a9) presentan cinco sitios de unión idénticos, en las interfases de las subunidades a, y por lo tanto, cada subunidad contribuiría tanto con la región principal como con la complementaria. La región principal, al parecer, está formada por al menos tres asas, llamadas A, B y C, y la complementaria por dos asas, llamadas D y E [Corringer *et al.*, 2000].

El dominio transmembranal inicialmente fue interpretado con base en el cálculo del índice hidropático, y se propuso que estaba formada por cuatro a hélices antiparalelas, de  $\sim 20$  AA (M1-M4). Sin embargo, estudios más recientes en los segmentos transmembranales del R-nic de *Torpedo* han permitido sugerir que la estructura secundaria de los segmentos M1, M3 y M4 es una mezcla de  $\beta$  plegada y de  $\alpha$  hélice, mientras que el segmento M2 parece ser una  $\alpha$  hélice excepto para seis AA, hacia la región intracelular, que incluyen la parte más estrecha del canal iónico [Arias, 1998; Corringer *et al.*, 2000; Changeux y Edelstein, 2001] (Fig. 4).

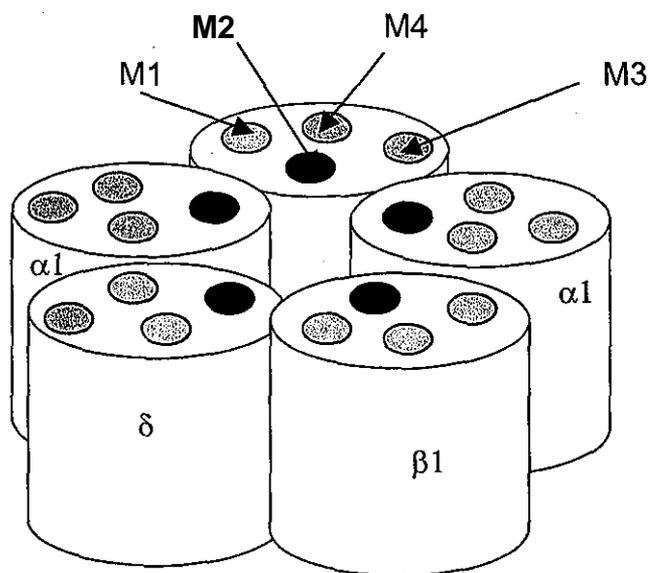


Figura 4. **El R-nic de *Torpedo***. El receptor está formado por cinco subunidades (ilustradas aquí como cilindros) y cada una de estas presenta cuatro segmentos transmembranales, M1, M2, M3 y M4. El canal iónico está constituido principalmente por el segmento M2 de cada subunidad.

Unwin y colaboradores, con base en el análisis de micrografías electrónicas obtenidas por ellos, plantearon que el canal iónico está formado por los segmentos M2 [Unwin, 1995, 2000]. Posteriormente, diversos grupos han aportado evidencia experimental en favor de esta propuesta, por ejemplo: utilizando pruebas hidrofóbicas con reactivos como diazoofluorano y colesterol se evidenció que los AA de las subunidades marcados por dichos compuestos están en contacto con la membrana celular, y pertenecen a los segmentos MI, M3 y M4. Además, mediante pruebas de mareaje de fotoafinidad, con bloqueadores de canal como la clorpromazina, se encontró que tales compuestos marcan algunos AA que pertenecen al interior del canal y son parte del segmento M2 [Karlin y Akabas, 1995; Arias, 1998; Corringier *et al.*, 2000].

En el R-nic de *Torpedo* los AA del canal fueron identificados a través del método de sustitución de cisternas, de mutaciones específicas y por el uso de compuestos fotoactivables que interactúan covalentemente con AA del canal iónico. Actualmente se acepta que un tercio de los AA del segmento MI y todo el segmento M2 forman el canal iónico. La estructura secundaria sugerida del canal consiste en una P plegada en el tercio externo (AA del segmento MI) y una hélice en la parte próxima a la superficie citoplásmica, excepto para seis AA en la parte más estrecha y cercana al citoplasma [Corringier *et al.*, 2000; Lindstrom, 2000; Changeux y Edelstein, 2001].

Cada segmento M2 presenta 19 AA sin carga eléctrica, que abarcan desde la metionina 243 hasta la valina 261 en la subunidad  $\alpha$  y los residuos alineados con éstos en las otras subunidades [Karlin y Akabas, 1995]. Estos AA están flanqueados por tres residuos cargados negativamente, uno en la

región extracelular (al-ácido glutámico-262), otro en la parte citoplásmica del poro (al-ácido glutámico-241) y otro más, ubicado a una vuelta de a hélice del anterior, hacia la región intracelular (al-ácido aspártico-238) [Karlin y Akabas, 1995, Arias, 1998] (ver Figura 5).

Los AA que se localizan hacia la luz del poro se combinan para formar siete u ocho anillos (*Torpedo* y a7 respectivamente), de los cuales tres presentan una carga neta negativa (anillos amónicos). Un anillo se localiza en la región extracelular (en la entrada del canal) y se denomina anillo externo. En los R-nic del *Torpedo* y en el a7 están formados por ácidos glutámicos en la posición 262 de la subunidad al y por residuos alineados en las otras subunidades (en a7 están en la posición 258); otro anillo, conocido como intermedio, forma la parte más estrecha del poro, y está formado por ácidos glutámicos en la posición 241 de la subunidad al y por residuos alineados en las otras subunidades (en a7 están en la posición 237); finalmente, otro anillo, denominado citoplasmático, se localiza en la parte citoplásmica del poro y está formado por ácidos aspárticos en la posición 238 en la subunidad al y por residuos alineados en las otras subunidades (en a7 están en la posición 234) [Karlin y Akabas, 1995, Arias, 1998; Changeux y Edelstein, 2001] (ver Fig. 5).

Las dimensiones del canal iónico se determinaron estudiando la permeabilidad a diferentes cationes orgánicos con dimensiones conocidas, y realizando mutaciones puntuales. A partir de los resultados de dichos trabajos, se propuso que la parte más estrecha del canal tiene un diámetro de  $\sim 7 \text{ \AA}$  y constituye el filtro de selectividad [Karlin y Akabas, 1995; Villaroel, 1998]. Este diámetro es lo suficientemente ancho para permitir el paso de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$

parcialmente hidratados. Además, midiendo el potencial de flujo (*streaming*) se determinó que esta región tiene una longitud de alrededor de 3 - 6 Å, que representa una vuelta de una a hélice, el cual, al parecer, está constituido por los anillos formados por al-treonina 244 y al-ácido glutámico 241 (anillo intermedio) y los AA alineados con éstos [Karlin y Akabas, 1995, Villarroel, 1998].

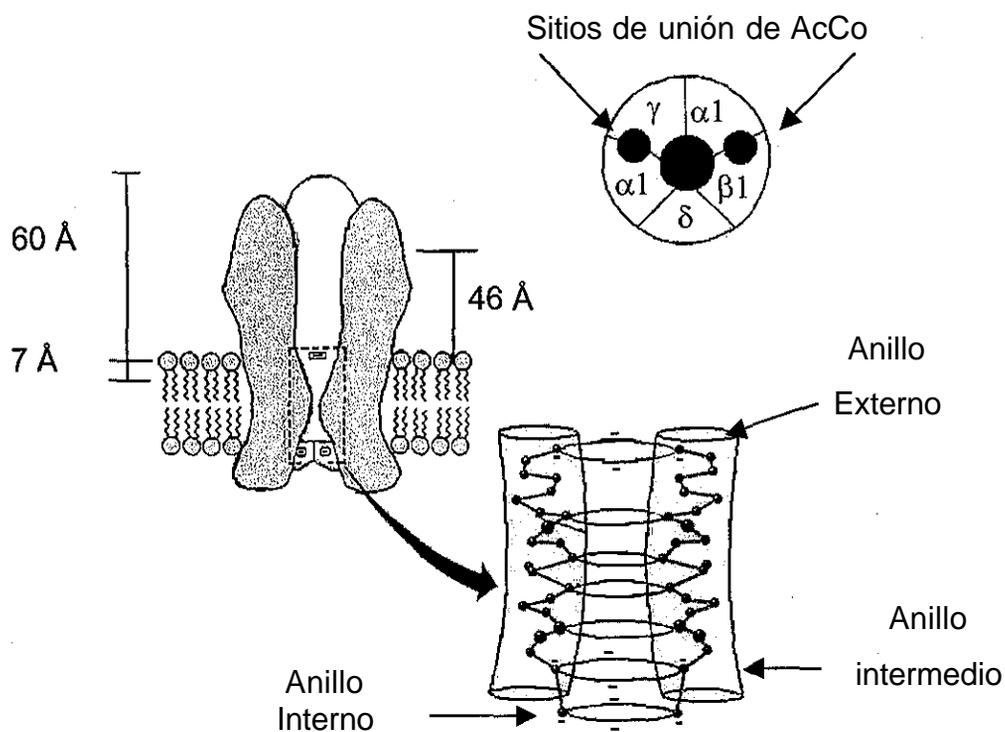


Figura 5. **Representación del R-nic de Torpedo.** En la figura superior se muestran los sitios de unión de AcCo y el canal iónico, En la parte central, se muestran las dimensiones del R-nic. En la figura inferior se muestran los anillos formados por AA de las cinco subunidades dentro del canal iónico. Modificado de Arias, 1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Diversos estudios han mostrado algunas características de la organización funcional del canal iónico. Se sabe que todos los R-nic son permeables a los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y dependiendo del subtipo de receptor de que se trate, la permeabilidad relativa entre los iones varía. Por ejemplo, la tasa de permeabilidad ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ ) en el R-nic musculares (*Torpedo*, muscular fetal y adulto) es de 0.2, mientras que en los del subtipo neuronal formados por la combinación de  $\alpha$  y  $\beta$  es de 0.5-2.5, en tanto que en los homómeros  $\alpha$  y  $\beta$  es  $>15$  [Changeux *et al.*, 1998].

Se han localizado algunas regiones dentro del canal iónico que son importantes para determinar las propiedades de la selectividad y la conductancia iónica en los R-nic. Los estudios de Hille y colaboradores en la década de los ochentas mostraron que las dimensiones físicas del poro son un factor importante en la permeabilidad del canal, ya que limita el flujo de moléculas cuyos radios cristalinos exceden el diámetro libre en la región del filtro de selectividad de  $\sim 7 \text{ \AA}$  [Hille, 1992; Villarroel, 1998].

Por otra parte, las mutaciones realizadas en los anillos aniónicos han aportado información relevante acerca del papel funcional de éstos. Las mutaciones en el anillo intermedio disminuyen progresivamente la conductancia de cationes grandes cuando el volumen de la cadena lateral de los AA incorporados se incrementa, lo que sugiere que tales residuos están involucrados en la selección de cationes de acuerdo con su tamaño [Villarroel, 1998].

Inicialmente se propuso que la carga negativa en el anillo externo impide electrostáticamente el paso de los aniones, dejando pasar sólo a los cationes [Martínez y Villarroel, 1998]. Sin embargo, el mecanismo parece ser más

complejo que la simple interacción electrostática, ya que la mutación de cualquiera de estos AA cargados por AA neutros no afecta mucho la conducción de cationes monovalentes pequeños. Además, se ha observado que algunos reactivos cargados negativamente tienen acceso hasta un tercio del canal iónico [Karlin y Akabas, 1995].

En los anillos intermedio e intracelular del R-nic del *Torpedo*, las mutaciones que disminuyen la carga eléctrica neta resultan en una disminución proporcional de la conductancia de  $K^+$  a nivel de canal unitario [Karlin y Akabas, 1995, Corringer *et al.*, 2000]. En el R-nic a7, la mutación de ácido glutámico 237 por alanina (anillo intermedio) abate la permeabilidad a  $Ca^{2+}$ , pero preserva la conductancia para el  $Na^+$  y  $K^+$ . Mutaciones similares en el R-nic muscular producen resultados parecidos [Arias, 1998; Karlin y Akabas, 1995; Corringer *et al.*, 2000; Lindstrom, 2000]. Finalmente, las mutaciones de leucina 254 y 255 (segundo anillo, cerca del lado extracelular en el R-nic *al*) por treonina suprimen la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  [Karlin y Akabas, 1995; Buisson *et al.*, 2000].

En lo que se refiere a la selectividad de la carga, al parecer está determinada no sólo por los AA del canal iónico. En los R-nic a7 la incorporación de un AA neutro apolar (prolina) entre las posiciones 237 y 238 (posición muy cercana al anillo aniónico intracelular) y la mutación en el anillo intermedio de ácido glutámico 237 por alanina y en el anillo externo de valina 251 por treonina, convierte al R-nic *al* de un canal catiónico a un canal aniónico selectivo al  $Cl^-$ , es decir, neutralizando las cargas de los anillos de cada lado de M2, en combinación con la inserción de una prolina en la parte

citoplásmica anterior al segmento M2, la permeabilidad al  $\text{Cl}^-$  aumenta [Karlin y Akabas, 1995; Corringier *et al*, 2000].

Como podrá observarse en los párrafos anteriores, aún no se han resuelto claramente todos los componentes de los mecanismos por los cuales se regulan la permeabilidad y la selectividad iónica. Sin embargo, podemos resumir que: a) los anillos amónicos participan en la selectividad catiónica; b) que el filtro de selectividad restringe el flujo iónico a moléculas que exceden su tamaño y que los iones permeables pueden atravesar el poro parcialmente hidratados; c) que otros AA que no forman parte del poro participan en la selectividad de los cationes; d) que las diferencias en la tasa de permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  están relacionadas con la naturaleza de los AA que forman el anillo intracelular [Karlin y Akabas, 1995; Villaroel, 1998]. Además, se ha propuesto que deben considerarse también otras propiedades físicas y químicas, como los grupos carbonil y amida de los AA que están expuestos en el canal [Karlin y Akabas, 1995; Buisson *et al*, 2000].

El dominio intracelular está formado por 109-142 residuos de AA que forman dos asas. Un asa pequeña une los segmentos transmembranales M1 y M2, y otra asa grande une los segmentos M3 y M4. En este dominio se han localizado sitios de posible fosforilación por tirosinas, en las subunidades P, 8 y y. Además, en membranas ricas en R-nic se han encontrado proteínas cinasas A y C, y se ha sugerido que los residuos serina de las diferentes subunidades del receptor pueden ser fosforiladas [Arias, 1998]. También se ha encontrado que la fosforilación aumenta la tasa de desensibilización en rAcCon musculares [Lindstrom, 2000].

## Estados funcionales de los R-nic

La acción fisiológica principal de la AcCo sobre los R-nic es desencadenada por la unión de las moléculas de AcCo con sus sitios de unión. El R-nic experimenta cambios de conformación, y diversas líneas experimentales sugieren que los R-nic pueden existir al menos en cuatro estados distintos, funcionalmente interconvertibles [Arias, 1998].

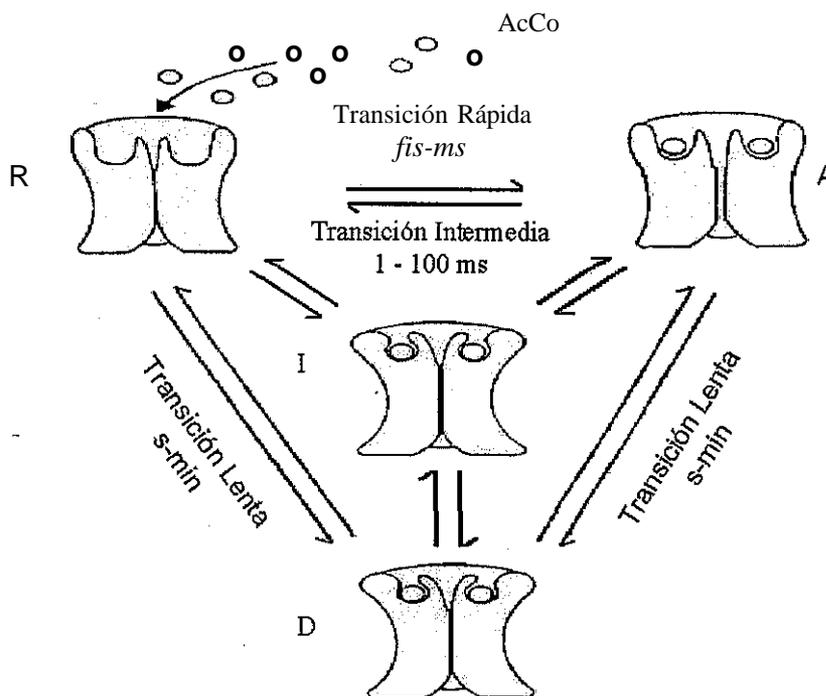


Figura 6. **Estados funcionales del R-nic.** El diagrama muestra los estados de conformación del R-nic. En ausencia de AcCo (mostrada como círculos vacíos) los R-nic están en estado de reposo (R), una conformación en la cual el canal iónico está cerrado. El canal cerrado puede abrirse por la unión de las moléculas de AcCo. El estado activo (A) presenta baja afinidad para agonistas ( $K_{0.5}$  de 10  $\mu$ M a 1 mM). La transición entre R y A es un proceso rápido en un intervalo de tiempo de  $\mu$ s a ms. En presencia prolongada del agonista los R-nic se vuelven refractarios a la acción de la AcCo. En el R-nic de *Torpedo* existen dos estados refractarios en donde el canal iónico no conduce, el intermedio (I) y el desensibilizado (D). Modificada de Arias, 1998.

Tales estados han sido interpretados considerando el esquema propuesto en 1957 por Katz y Thesleff, y el esquema básico actual consiste en: 1) un estado de reposo R, que predomina en ausencia del agonista y en donde la probabilidad de apertura del canal es muy baja; 2) un estado activo A, donde la probabilidad de apertura del canal se eleva al unirse las moléculas de AcCo a sus respectivos sitios de unión. El canal se abre en un intervalo de tiempo de  $\mu$ s a ms y muestra baja afinidad por la AcCo ( $10^{-10}$  p.M-1  $\mu$ M); 3) y 4) dos estados desensibilizados denominados I (inicial) y D (tardío), que predominan después de la exposición del agonista por varios cientos de milisegundos, en los que el canal no conduce iones. Los estados desensibilizados (I) y (D) muestran alta afinidad por la AcCo ( $10^{-8}$  nM- $10^{-6}$  M) y presentan refractariedad a la activación por la AcCo en un intervalo de tiempo de ms a minutos [Katz y Thesleff, 1957; Arias, 1998; Paterson y Nordberg, 2000] (ver Fig. 6).

El esquema anterior ha sido propuesto para los R-nic musculares. Aunque se cree que en los subtipos neuronales los estados de conformación son semejantes, se tiene evidencia de que la cinética en las transiciones varía en función del subtipo de R-nic [Francis y Papke, 2000] (Tabla 5).

El proceso de transición en el canal iónico, entre un estado cerrado y uno abierto, y viceversa, se conoce como el mecanismo de compuerta (*gating*). En los R-nic este mecanismo no se conoce bien; sin embargo, con base en evidencia experimental se han propuesto dos explicaciones acerca del funcionamiento de la compuerta. Nigel Unwin [1995; 2000] comparando las micrográficas electrónicas en ausencia y presencia de AcCo, propuso que al unirse la AcCo a sus sitios de unión, se producen cambios locales que se propagan hasta el poro, cuya región más estrecha (el anillo de leucina en los

R-nic del *Torpedo*) gira de tal manera que permite el flujo iónico. En estado cerrado este anillo protruye el poro y constituye la compuerta.

Por su parte, Karlin y colaboradores [1995; Wilson y Karlin, 2001], con base en experimentos realizados en R-nic del subtipo fetal de ratón con el método de sustitución por cisternas, proponen que la unión del ligando a los sitios de unión provoca un cambio de conformación, en el cual los segmentos M2 y parte de los AA MI se desplazan y forman un arreglo casi simétrico y estable. El movimiento de los AA de los segmentos transmembranales MI y M2 de la subunidad al abren o cierran el canal, de tal manera que estos cambios de conformación forman parte del proceso de compuerta, la cual se localiza en la región que abarca la treonina en la posición 244 (en el interior del canal) y la glicina en la posición 240 dentro del asa intracelular que une los segmentos MI y M2 de la subunidad  $\alpha 1$ . Además, proponen que en estado desensibilizado la compuerta se extiende hasta la serina en la posición 248 de la misma subunidad.

### **Distribución y papel funcional de los R-nic**

Los R-nic se encuentran distribuidos en el organismo de una gran variedad de miembros del reino animal, entre los que se incluyen tanto invertebrados como vertebrados. En estos últimos (aves y mamíferos) se localizan principalmente en la unión neuromuscular y en el sistema nervioso [Clarke, 1999].

En los vertebrados, los R-nic musculares se encuentran densamente ubicados en las membranas de las fibras musculares esqueléticas y forman

sinapsis con las neuronas motoras en una región particular conocida como placa terminal o unión neuromuscular. En contraste, los R-nic musculares fetales, antes de que se forme la placa neuromuscular se encuentran difundidos a lo largo de toda la superficie de las fibras musculares [Aidley, 1998; Kandel y Siegelbaum, 2000a; Lindstrom, 2000].

En el músculo de vertebrados en etapa fetal, los R-nic presentan una subunidad  $\gamma$  en lugar de  $\delta$ , presente en el R-nic adulto; esta sustitución trae como consecuencia un cambio en sus propiedades biofísicas. A un potencial de  $-100$  mV, el R-nic fetal ( $2\alpha 1(315\gamma)$ ) muestra una conductancia promedio de  $40$  pS y un tiempo de apertura promedio del canal de  $11$  ms, en tanto el adulto ( $2\alpha 1\pi 5\delta$ ) presenta una conductancia de  $59$  pS y un tiempo de apertura promedio de  $5.6$  ms [Mishina *et al*, 1986]. Se cree que durante el desarrollo fetal el R-nic (subtipo fetal) permite mayor ingreso de corriente —ya que aunque su conductancia es menor, su tiempo de apertura es mayor— durante las corrientes miniatura de placa que pueden promover las contracciones espontáneas durante el desarrollo del músculo, ya que la actividad muscular induce diferenciación en la unión neuromuscular [Jaramillo *et al*, 1988].

En las aves y mamíferos que ya presentan placa terminal, cuando un potencial de acción alcanza las terminales de una neurona motora presináptica induce la liberación de AcCo, entonces el transmisor difunde a través de la hendidura sináptica, y cuando se une a los R-nic presentes en la placa terminal, favorece la apertura de sus respectivos canales iónicos que permiten el flujo de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de la fibra muscular. La entrada neta de cationes, produce una despolarización sináptica llamada potencial de la placa terminal [Kandel y Siegelbaum, 2000a].

El estímulo viaja pasivamente a lo largo de la fibra muscular, pero la despolarización producida generalmente rebasa el umbral de activación de los canales de sodio activados por voltaje, localizados en las proximidades de la placa terminal, con lo cual se produce la activación de estos canales y la generación de un potencial de acción. Como consecuencia del potencial de acción se produce la liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares que provocaran la contracción de las miofibrillas [Kandel y Siegelbaum, 2000a].

En el sistema nervioso periférico (SNP), se ha identificado el ARNm de las subunidades a3, a5, a7, (32 y [34, en los ganglios autónomos de embriones y neonatos de pollo y rata. Durante el desarrollo del SNP, las diferentes subunidades son finamente reguladas. Por ejemplo, en el ganglio ciliar de pollo el ARNm de las subunidades a3, a5, a7, p2 y p4 son detectadas entre los días E8 y E18 [Zoli, 2000], pero en la etapa prenatal la expresión de algunas de ellas se reprime. Por ejemplo, la subunidad a3 se expresa ampliamente en la cauda cerebral (E11-E18) y posteriormente no se detecta. Además, en ratas adultas, mediante pruebas de hibridación, se ha identificado en los ganglios sensoriales el ARNm de las subunidades ct3, a4, a5, P2 y p4 [Paterson y Nordberg, 2000; Sargent, 2000]. En los humanos, el ARNm de las subunidades a3, ot4, ot5, a7, P2, P3 y P4 está presente en muchas regiones cerebrales y en la médula espinal en el primer trimestre de la etapa fetal [Zoli, 2000].

Los R-nic están presentes en varios ganglios del SNP, principalmente en las divisiones simpática y parasimpática. En estas divisiones, al producirse un potencial de acción presináptico, la AcCo es liberada por las terminales de las

neuronas preganglionares, que al interactuar con R-nic evocan un potencial excitatorio postsináptico, lo suficientemente grande para generar un potencial de acción en las neuronas postganglionares [Iversen *et al.*, 2000; Zoli, 2000].

En el SNC de vertebrados, los R-nic, en general, se expresan en baja densidad, y su patrón de distribución es relativamente heterogéneo. La mayoría de los datos obtenidos hasta la fecha provienen de estudios realizados en ratas y pollos, y en menor grado en humanos [Paterson y Nordberg, 2000]. En la Tabla 6 se muestra la distribución del ARNm de las diferentes subunidades localizadas en el SNC de humanos [Clarke, 1999; Lukas, 1998; Paterson y Nordberg, 2000].

En las neuronas del SNC, la interacción de la AcCo con los R-nic produce una señal excitadora, la cual es integrada junto con otras señales —que pueden ser tanto excitadoras como inhibitorias—, y subsecuentemente, si la señal integrada es suficiente para alcanzar en el cono axónico el potencial umbral, se producirá un potencial de acción. Los potenciales sinápticos excitadores producidos por una sola neurona típicamente son pequeños como para alcanzar el umbral de excitación y provocar un potencial de acción postsináptico [Kandel y Siegelbaum, 2000b].

En la mayoría de los casos la inervación colinérgica no es el principal regulador de la función de la neurona blanco, sino más bien un modulador de la actividad de otros tipos de transmisión [Zoli, 2000]. En las neuronas del SNC los R-nic no están limitados a la terminal postsináptica, sino que también se encuentran en la presinapsis, en sitios extrasinápticos y en la perisinapsis, donde ellos podrían modular la función neural. Además, la evidencia de su presencia en sinapsis típicas (R-nic postsinápticos) en el SNC es limitada, y es probable que en muchos sistemas centrales funcione preferentemente a través

de la transmisión de volumen. Los R-nic postsinápticos son importantes en el control de la transmisión sináptica rápida en el hipocampo y la corteza cerebral [Clementi *et al*, 2000; Zoli, 2000].

**Tabla 6. Distribución del ARNm que codifica para las subunidades que conforman los diferentes R-nic, en el sistema nervioso de humanos adultos (h) y ratas adultas (r).**

**Sólo se mencionan los sitios con mayor expresión.**

Subunidad	Región
a2	corteza (r), hipocampo (r) y tallo cerebral (r).
a3	corteza (rh), tálamo (rh), hipocampo (rh) y tallo cerebral (r).
ct4	corteza (rh), hipocampo (rh), tálamo (r), hipotálamo (r), tallo cerebral (r) y cerebelo (r).
α5	corteza (rh), hipocampo (rh), tálamo (h) y tallo cerebral (r).
a6	amígdala (r), tálamo (r) y tallo cerebral (r).
α7	corteza (rh), hipocampo (rh), tálamo (h), hipotálamo (r), tallo cerebral y médula espinal (r).
a8	ausente
α9	adenohipófisis (r)
α10	oído interno (h)
p2	corteza (rh), hipocampo (r), ganglios basales (r), tálamo (rh), hipotálamo (rh), retina (r), tallo cerebral (r), cerebelo (r) y médula espinal (r).
p3	hipocampo (h), ganglios basales (r), tálamo (rh), retina (r) y tallo cerebral (r).
P4	corteza (rh), hipocampo (rh), tálamo (rh), hipotálamo (r) y tallo cerebral (r).

Datos tomados de Paterson y Nordberg, 2000; Sargent, 2000; Le Novère y Changeux, 2001.

Se ha sugerido que la mayoría de los procesos en los que participan los R-nic se deben a la activación de R-nic presinápticos, y se ha demostrado que éstos modulan la liberación de diversos neurotransmisores. La liberación de DA de neuronas dopaminérgicas es parcialmente controlada por R-nic que contienen a la subunidad  $\alpha 4$ , y posiblemente también a la  $\alpha 6$ . La liberación de glutamato está principalmente controlada por R-nic *al*. En el ratón la subunidad  $\beta 2$  es importante en el control presináptico de la liberación de GABA y a la respuesta a la nicotina en neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto *et al.*, 2000; Clementi *et al.*, 2000].

Los R-nic presinápticos están involucrados en varias funciones, como el aprendizaje, la atención, la consolidación de la memoria, la excitación sexual, la percepción sensorial, el control de la actividad motora, la percepción del dolor y la regulación de la temperatura corporal. Los R-nic postsinápticos son importantes en el control de la transmisión sináptica rápida en el hipocampo y la corteza cerebral [Clementi *et al.*, 2000].

A continuación se describe brevemente la participación de los R-nic en los diferentes procesos fisiológicos y patológicos, así como las subunidades que conforman dichos receptores.

#### *Los R-nic en el control central de la locomoción*

En el control central de la locomoción, los R-nic presentes en el estriado y en otras áreas del SNC y que contienen a las subunidades  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  pueden controlar la actividad locomotora por medio de la liberación de DA. Los R-nic

que contienen a la subunidad  $\beta 3$  son expresados en la presinapsis o a nivel preterminal [Picciotto *et al*, 2000; Clementi *et al*, 2000].

### *Los R-nic en el dolor*

En pruebas conductuales con ratones tratados con nicotina y con epibatidina (agonista nicotínico) se incrementa el tiempo de latencia al dolor, en las pruebas de la plancha caliente y del golpe en la cola. Por otra parte, en ratones *Knock Out*, la falta de una de las subunidades del receptor neuronal  $\alpha 4\beta 2$  reduce el tiempo de latencia en las pruebas conductuales antes mencionadas, y reduce la sensibilidad a la nicotina. Además, el tratamiento con el compuesto ABT-594, sobre el cual se ha sugerido que es un agonista selectivo para R-nic  $\alpha 4\beta 2$ , muestra propiedades antinociceptivas, y dicho efecto es bloqueado por el antagonista mecamilamina. Estos experimentos indican que los R-nic que participan en el control del dolor están formados principalmente de subunidades  $\alpha 4\beta 2$  [Picciotto *et al*, 2000; Clementi *et al*, 2000].

### *Los R-nic en los procesos cognitivos*

En diversos paradigmas experimentales usados para evaluar la memoria en roedores y primates no humanos, el tratamiento con nicotina y algunos agonistas nicotínicos (lobelina, ABT-418, etc.) durante periodos cortos y largos, mejoran el desarrollo de los animales en dichas pruebas. Además, en estudios en donde se han realizado lesiones en diversos núcleos colinérgicos, la nicotina ha restaurado la realización adecuada de las tareas [Paterson y Nordberg. 2000; Picciotto *et al*, 2000].

Por otra parte, se ha sugerido que los R-nic participan en el proceso de aprendizaje. Además de las pruebas conductuales que apoyan esta idea, se han realizado experimentos con ratones *Knock Out* para la subunidad p2, en los cuales se observa que estos animales muestran deficiencias en el aprendizaje espacial. Sin embargo, en los animales "Knock Out" para *α1* no hay diferencias observables con los ratones controles, por lo que se ha sugerido que los R-nic formados con la subunidad  $\alpha 2$  son los que participan principalmente en los procesos de aprendizaje [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto et al., 2000].

#### *Los R-nic en la conducta adictiva*

La participación de los R-nic en la conducta adictiva de fumar tabaco es ampliamente reconocida. Se ha sugerido que las vías mesolímbicas dopaminérgicas median los efectos adictivos de la nicotina y otras sustancias de abuso. Se sabe que la nicotina estimula la liberación de DA en las neuronas de esta vía, pero hasta ahora se desconocen los mecanismos que producen tolerancia y adicción. Además, también se ignoran que subtipos de receptores participan en tales respuestas. No obstante, los efectos causados por la abstinencia de fumar tabaco, como nerviosismo, irritabilidad, ansiedad y falta de concentración pueden ser revertidos por la aplicación del antagonista nicotínico mecamilamina, lo que sugiere que la activación de los R-nic es importante para los síntomas en la abstinencia [Paterson y Nordberg, 2000; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000].

### *Los R-nic en la epilepsia nocturna del lóbulo frontal*

Este padecimiento es un tipo de epilepsia parcial que ocurre durante el sueño ligero, y al parecer es ocasionado por cualquiera de las dos mutaciones que ocurren en la subunidad  $\alpha 4$ . La primera mutación consiste en la sustitución de la serina ubicada en la posición 247, por una fenilalanina. Esta mutación ocurre en el segmento M2 de la subunidad  $\alpha 4$ . En la segunda mutación ocurre una inserción de una leucina, también en el segmento M2 de la subunidad  $\alpha 4$  [Paterson y Nordberg, 2000; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000].

En experimentos en los que se han expresado los R-nic  $\alpha 4(32$  mutados en ovocitos de *Xenopus*, se ha encontrado que la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y la probabilidad de apertura del canal se encuentran reducidas. Esta última alteración posiblemente se deba a un aumento en la tasa de desensibilización. También se ha observado que tanto el tiempo de recuperación del estado desensibilizado, como la afinidad por la AcCo se encuentran reducidas [Paterson y Nordberg, 2000].

Debido al hecho de que la epilepsia es el resultado de una excesiva activación neuronal, parece contradictorio que la reducción en la actividad de los R-nic cause este trastorno. Sin embargo, se ha propuesto que los R-nic  $\alpha 4(32$  presinápticos, al disminuir la liberación de GABA y glicina, provocarían un aumento de la excitabilidad cortical [Paterson y Nordberg, 2000; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000].

### *Los R-nic en la enfermedad de Alzheimer*

Esta enfermedad es una condición neurodegenerativa que afecta principalmente a personas mayores de sesenta y cinco años. Se caracteriza por

un deterioro progresivo de sus facultades cognitivas superiores, incluyendo pérdida de la memoria. Este tipo de demencia senil está asociada con la degeneración de neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal que inervan la corteza, la amígdala y el hipocampo [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto *et ai*, 2000; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000].

En estudios *post mortem*, además de la presencia de cúmulos neurofibrilares intracelulares (proteína tau) y de las placas neuríticas seniles extracelulares (péptido P amiloide), también se observa una pérdida de la inervación colinérgica en la corteza cerebral y en el hipocampo. Se ha determinado que los R-nic que más se pierden son los  $\alpha 4(32$  (la subunidad  $\alpha 4$  es la más afectada). Adicionalmente, se ha reportado que en la vejez disminuyen los niveles de ARNm para las subunidades  $\alpha 4$  y  $(32$  (en corteza) y  $\alpha 7$  (en hipocampo), en cambio, la subunidad  $\alpha 3$  no sufre alteración, por lo que se ha sugerido que la pérdida de los R-nic  $\alpha 4(32$  está relacionada con las alteraciones observadas en estos enfermos. Además, estudios en ratones *Knock Out* para la subunidad  $\alpha 2$  muestran una pérdida significativa de sitios de unión para nicotina tritiada y presentan deficiencias en el aprendizaje [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto *et a/.*, 2000; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000].

### *Los R-nic en la enfermedad de Parkinson*

La enfermedad de Parkinson es otro padecimiento neurodegenerativo, en el cual ocurre una degeneración de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. Además de la disfunción motora, que consiste en rigidez muscular, temblor y bradicinecia, los enfermos de Parkinson a menudo presentan

disfunciones cognitivas o demencia. Al igual que en la enfermedad de Alzheimer, existe una disminución de células colinérgicas en el cerebro anterior basal y una reducción en el número de sitios de unión de alta afinidad a nicotina [Paterson y Nordberg, 2000; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000].

Por otra parte, diversos estudios epidemiológicos muestran que la estimulación de los R-nic por fumar cigarrillos de tabaco parece proveer cierta protección contra esta enfermedad. En ratones, el tratamiento crónico con nicotina protege la región nigroestriatal contra lesiones mecánicas y por toxinas. Asimismo, protege las neuronas dopaminérgicas de la degeneración y se incrementan los niveles de dopamina. Por otra parte, en monos tratados con neurotóxicos se ha encontrado que la aplicación del compuesto SIB-1508Y (agonista selectivo para  $\alpha 4(32)$ ) mejora la realización de tareas motoras y cognitivas, pero en animales control no se observan diferencias [Paterson y Nordberg, 2000; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000].

### *Los R-nic en la esquizofrenia*

Este trastorno es una psicosis crónica. Se presenta entre la adolescencia tardía y la etapa adulta temprana, y se caracteriza por alucinaciones, desilusiones, pensamientos extraños y apatía. Aunque se desconoce la etiología de la enfermedad, se considera que existe un componente genético, pues se han identificado varias alteraciones en los cromosomas que parecen estar relacionadas con la enfermedad, si bien tales alteraciones no se presentan en todos los casos de esquizofrenia [Paterson y Nordberg, 2000].

Se ha sugerido que la sintomatología de la enfermedad se debe a un aumento en la secreción de DA, y la posible relación de los R-nic proviene de estudios epidemiológicos en los que se reporta que, entre los pacientes con

esta afección, la tasa de fumadores es de 90%, frente a la de 20-30% observada en la población general. En estudios *post mortem* de pacientes esquizofrénicos, se ha encontrado que el número de sitios de unión de la  $\alpha$ -bungarotoxina en el hipocampo están reducidos, por lo que al parecer hay una expresión anormal en la subunidad *al* [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto *et al.*, 2000]. Se ha sugerido como una posible explicación que, de alguna forma, el fumar ayuda a disminuir los problemas de atención asociados con la esquizofrenia. Al parecer, los esquizofrénicos prestan una particular atención a los estímulos ambientales que generalmente son ignorados por personas sanas, y se ha planteado que los mecanismos neuronales que filtran estas señales sensoriales están dañados [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto *et al.*, 2000; Mihailescu y Drucker-Colín, 2000].

En sujetos normales un estímulo auditivo inicial desencadena una respuesta excitatoria que también activa mecanismos inhibitorios, los cuales, ante un subsecuente estímulo auditivo, disminuyen la respuesta excitatoria. En los esquizofrénicos, los estímulos auditivos subsecuentes no disminuyen eficientemente la excitación. Esta alteración es temporalmente aliviada con la administración de nicotina o después de fumar. También se han detectado altos niveles de anticuerpos contra R-nic, además de que existe una reducción significativa de R-nic *al* en la corteza frontal de pacientes esquizofrénicos, por lo que la disminución de tales receptores puede ser importante en este padecimiento [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto *et al.*, 2000].

### *Los R-nic en la sobrevivencia neuronal!*

Al parecer, los R-nic también están involucrados en la sobrevivencia neuronal en la vejez, ya que en ratones *Knock Out* para la subunidad  $\alpha 3$  muestran cambios específicos en la corteza cerebral: hipotrofia neocortical, pérdida de neuronas hipocampales y astro y microglíosis, un cuadro semejante al de una enfermedad degenerativa, el correlato funcional de estas alteraciones histopatológicas es el daño en el aprendizaje espacial [Clementi *et al.*, 2000].

### *Los R-nic en la ansiedad y la depresión*

En varios estudios epidemiológicos se ha mostrado que entre los pacientes con trastornos de ansiedad y depresión, el consumo de cigarrillos de tabaco es más elevado con respecto al resto de la población, y se ha sugerido que la nicotina podría tener efectos benéficos en estos pacientes. En modelos animales de ansiedad y depresión, también se ha sugerido que la nicotina puede tener efectos semejantes a los ansiolíticos y antidepresivos [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto *et al.*, 2000]. Además, Salín-Pascual y colaboradores [1996] reportaron que la aplicación de nicotina a pacientes no fumadores tuvo efectos antidepresivos.

El sistema colinérgico septo-hipocampal se ha relacionado con el control de la ansiedad y la depresión. Se ha demostrado que la nicotina actúa directamente en el hipocampo y produce efectos antiansiolíticos. Las deficiencias conductuales asociadas con el modelo *learned helplessness* (desesperanza aprendida) han sido prevenidas por lesiones en el hipocampo y en el septum ventromedial. Por lo tanto, las proyecciones del hipocampo a la amígdala deben estar involucradas en la formación de memoria emocional asociada con el *shock* inducido con *learned helplessness*. De este modo, la

nicotina puede producir sus efectos antidepresivos, al actuar directamente en el hipocampo y/o septum, o a través de la amígdala [Paterson y Nordberg; 2000; Picciotto *et al*, 2000]. Por otra parte, en ratas *Flinders Sensitive Line* (FSL), usando la prueba de nado forzado como modelo de depresión, se observó que la nicotina tiene efectos antidepresivos [Paterson y Nordberg, 2000; Picciotto *et al*, 2000].

Finalmente en la Tabla 7 se muestra la información resumida acerca de los subtipos de R-nic relacionados con los diversos procesos antes descritos.

**Tabla 7. Relaciones entre los diferentes subtipos de R-nic neuronales y los procesos asociados con estos.**

Proceso	Posible sitio de acción nicotínica	Potencial subtipo de R-nic
reforzamiento	sist. dopaminérgico, AVT y NA	cc4/p2/cc6,/ 03/
sensibilización	AVT	<i>al</i> ; ct4/p2/a6,/ p3
locomoción -hiper- -hipo-	AVT y NA HMyNIP	cc4/p2/cx6,/ P3 ct3/p4; cc2,/ p4
antinocicepción	rafe y tálamo	a4/p2
trabajo de memoria	corteza e hipocampo	¿?
aprendizaje asociado al miedo	amígdala, tallo cerebral, vía tálamo cortical	a4/p2
neurodegeneración	hipocampo, corteza	cc4/p2
ansiedad	sist. septo hipocampal	<x7
depresión	sist. septo hipocampal	a4/p2, <i>al</i>

Abreviaturas: AVT, área tegmental ventral; NA, núcleo acumbens; Ha, habénula media; NfP, núcleo interpeduncular. Tomada de Picciotto *et al*., 2000.

## Modulación de los R-nic por compuestos exógenos

La función de los diferentes subtipos de R-nic está sujeta a la modulación antagónica de una gran variedad de compuestos que presentan diferentes

estructuras químicas y que interactúan con los R-nic en distintos sitios. Con base en el sitio de unión, dichos compuestos han sido clasificados en antagonistas o inhibidores competitivos, y son aquellos que disminuyen la respuesta a la AcCo, al interactuar en el mismo sitio de unión de la AcCo. El mecanismo de inhibición radica fundamentalmente en impedir la unión de la AcCo o de otros agonistas [Arias, 1998; Paterson y Nordberg, 2000].

Por otra parte, los antagonistas o inhibidores no competitivos (INC) también tienen un efecto inhibitorio, pero interactúan en sitios distintos al de unión de la AcCo. Los INC, a su vez, se han clasificado en luminales, cuyo sitio de unión se localiza dentro del canal iónico, y en no luminales, en los cuales el sitio de unión se localiza principalmente en la interfase entre la proteína del receptor y los lípidos de la membrana celular [Arias, 1998; Paterson y Nordberg, 2000].

Los INC luminales presentan un mecanismo conocido como modulación estética, en la cual el compuesto inhibidor interacciona con su sitio de unión localizado en el interior del canal iónico y obstruye el flujo de iones. Los INC no luminales presentan otro mecanismo conocido como modulación alostérica, en la cual la interacción del INC con su sitio de unión específico, induce un cambio de conformación hacia un estado desensibilizado en el receptor [Arias, 1998; Paterson y Nordberg, 2000].

Los INC luminales conforman un grupo heterogéneo en el que se incluyen compuestos como la cloropromazina, la fenciclinina, el MK801, anestésicos locales, histicotóxina, amantidina y el etanol. Tales compuestos presentan una constante de disociación en un intervalo de concentraciones de nM a < 100  $\mu$ M, y se cree que los sitios de unión están compuestos por AA del segmento transmembranal M2 de cada subunidad. La unión de estos ligandos

a su sitio es favorecida por la activación de R-nic con agonistas y produce un bloqueo rápido del canal, lo que generalmente es reversible [Arias, 1998; Paterson y Nordberg, 2000].

Es importante resaltar que tanto el desplazamiento por otros compuestos de la histrionicotoxina y la fenciclidina trinadas (pruebas de canal abierto), como la modificación en la sensibilidad del bloqueo por parte de INC en su sitio de unión, ante cambios en el potencial de membrana, se consideran como evidencias en favor de un mecanismo de bloqueo estérico [Arias, 1998; Paterson y Nordberg, 2000].

En los INC no luminales se ha sugerido que existen entre 10 y 20 sitios de unión, algunos en la interfase entre la proteína del receptor y los lípidos de la membrana. En este grupo de compuestos se incluyen los ácidos grasos, como el linolénico y el linoleico; a los esteroides, como la progesterona; los corticosteroides y la dexametazona, la alfaxalona y la betaxalona, y también los anestésicos isoflurano y la benzocaína [Arias, 1998; Paterson y Nordberg, 2000]. En el interior celular existen, asimismo, sitios alostéricos adicionales. La fosforilación por proteínas cinasas A y C o por tirosinas cinasas de residuos definidos dentro del asa citoplasmática resulta en desensibilización del canal iónico [Arias, 1998]. Algunas sustancias farmacológicamente activas aumentan de modo indirecto la desensibilización de los R-nic, a través de la fosforilación. Esto generalmente ocurre al inducir cambios en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y la activación de proteínas cinasas sensibles al  $Ca^{2+}$ , tales como las antes mencionadas. Por ejemplo, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y la sustancia P aumentan la desensibilización del receptor al activar enzimas fosforilantes [Paterson y Nordberg, 2000].

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace varias décadas se sabe que la 5-HT inhibe la actividad de los R-nic. En 1968, Colomo y colaboradores demostraron que la 5-HT inhibía la respuesta de la AcCo en la unión neuromuscular. Posteriormente, este efecto fue confirmado y ampliado a algunos R-nic del subtipo neuronal [Akasu y Koketsu, 1986; Grassi *et al.*, 1993; García-Colunga y Miledi, 1995; 1996; 1999]. En fechas recientes, García-Colunga y Miledi [1994; 1995; 1996; 1999; García-Colunga *et al.*, 1997b] han demostrado que diversos agentes serotoninérgicos, tanto agonistas como antagonistas, tienen efectos inhibitorios sobre los R-nic de los subtipos muscular y neuronal. Además, algunos inhibidores selectivos del sistema de recaptura de 5-HT (fluoxetina, paroxetina, sertalina, venlafaxina, y nefazadona) han mostrado un efecto inhibitorio sobre los R-nic [García-Colunga *et al.*, 1997a; Hennings *et al.*, 1997; Maggi *et al.*, 1998; Fryer y Lukas, 1999a, 1999b].

Por otra parte, en 1981 dos grupos de investigación utilizaron pruebas de canal abierto en R-nic de *Torpedo* sugirieron que los antidepresivos tricíclicos imipramina, desimipramina, clorimipramina, nortriptilina y amitriptilina inhibían la respuesta a AcCo, al interactuar dentro del canal iónico de R-nic de *Torpedo* [Aronstam, 1981; Aronstam y Narayanan, 1981; Eldeñawi *et al.*, 1981]. En 1993, Rana *et al.* observaron que la imipramina y la desimipramina inhibían la respuesta inducida por el agonista nicotínico dimetilpiperacina en

células SY-SY5Y de neuroblastoma humano. Posteriormente, Izaguirre y colaboradores [1997] mostraron que estos mismos compuestos inhibían la corriente inducida por nicotina en células cromafnes.

En conjunto, todos estos estudios permiten plantear la siguiente hipótesis de trabajo.

## HIPÓTESIS

Los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas; imipramina, 6-nitro-quipazina, trazodona, clorimipramina, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina y zimelidina interactúan con los R-nic alterando su función.

## OBJETIVOS

1. Determinar los efectos de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas: imipramina, 6-nitro-quipazina, trazodona, clorimipramina, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina y zimelidina sobre R-nic de *Torpedo*, muscular y neuronal  $\alpha 2\text{p}4$ .
2. Realizar un análisis comparativo de los efectos de estos compuestos en los R-nic de *Torpedo*, musculares y neuronales  $\alpha 2\text{p}4$ .
3. Evaluar las modificaciones de los estados funcionales en los R-nic por efecto de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas.
4. Proponer un posible mecanismo de acción de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas sobre los R-nic.

células SY-SY5Y de neuroblastoma humano. Posteriormente, Izaguirre y colaboradores [1997] mostraron que estos mismos compuestos inhibían la corriente inducida por nicotina en células cromafnes.

En conjunto, todos estos estudios permiten plantear la siguiente hipótesis de trabajo.

## HIPÓTESIS

Los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas; imipramina, 6-nitro-quipazina, trazodona, clorimipramina, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina y zimelidina interactúan con los R-nic alterando su función.

## OBJETIVOS

1. Determinar los efectos de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas: imipramina, 6-nitro-quipazina, trazodona, clorimipramina, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina y zimelidina sobre R-nic de *Torpedo*, muscular y neuronal  $\alpha 2\text{p}4$ .
2. Realizar un análisis comparativo de los efectos de estos compuestos en los R-nic de *Torpedo*, musculares y neuronales  $\alpha 2\text{p}4$ .
3. Evaluar las modificaciones de los estados funcionales en los R-nic por efecto de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas.
4. Proponer un posible mecanismo de acción de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas sobre los R-nic.

células SY-SY5Y de neuroblastoma humano. Posteriormente, Izaguirre y colaboradores [1997] mostraron que estos mismos compuestos inhibían la corriente inducida por nicotina en células cromafnes.

En conjunto, todos estos estudios permiten plantear la siguiente hipótesis de trabajo.

## HIPÓTESIS

Los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas; imipramina, 6-nitro-quipazina, trazodona, clorimipramina, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina y zimelidina interactúan con los R-nic alterando su función.

## OBJETIVOS

1. Determinar los efectos de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas: imipramina, 6-nitro-quipazina, trazodona, clorimipramina, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina y zimelidina sobre R-nic de *Torpedo*, muscular y neuronal  $\alpha 2\text{p}4$ .
2. Realizar un análisis comparativo de los efectos de estos compuestos en los R-nic de *Torpedo*, musculares y neuronales  $\alpha 2\text{p}4$ .
3. Evaluar las modificaciones de los estados funcionales en los R-nic por efecto de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas.
4. Proponer un posible mecanismo de acción de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas sobre los R-nic.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Los protocolos experimentales consistieron básicamente en registros electrofisiológicos en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, los cuales fueron utilizados como sistemas de expresión heterólogo de R-nic del órgano eléctrico del *Torpedo californica*, de la forma fetal del subtipo muscular de ratón (2ctiPiy5) y del a2P4 de neuronas de rata. La expresión de R-nic se obtuvo mediante la microinyección de ARNm total del órgano eléctrico de la raya *Torpedo californica*, en tanto la expresión de los R-nic muscular fetal y el neuronal a2p4 se logró mediante la microinyección de una mezcla del ARNm complementario (cARNm) de las subunidades que conforman cada subtipo de R-nic. En la Figura 7 se esquematiza el diseño experimental utilizado en este trabajo.

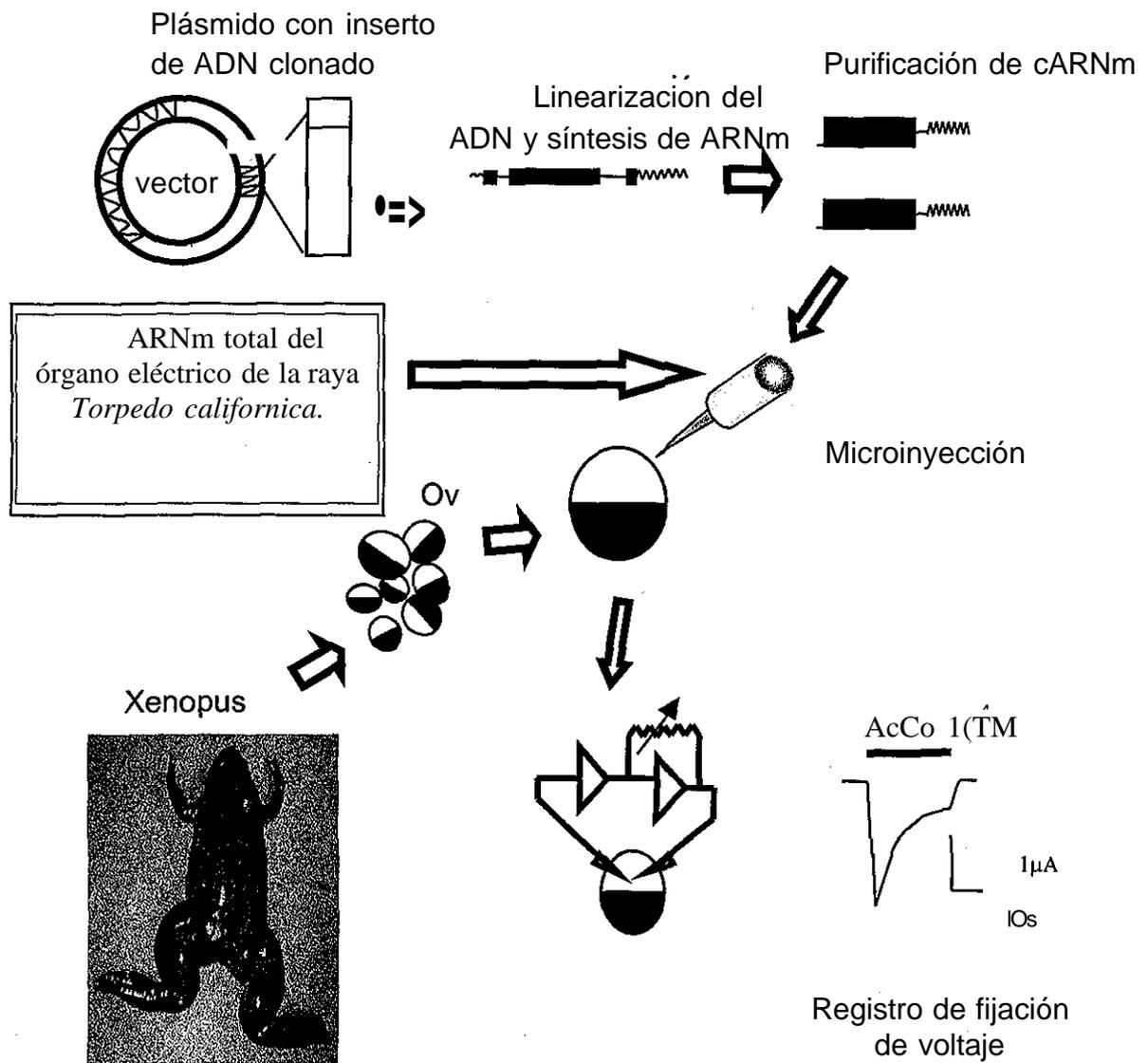


Figura 7. **Esquema del diseño experimental.** Esencialmente consiste en evaluar el efecto de los diferentes compuestos inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas sobre la corriente inducida con AcCo, mediante registros de fijación de voltaje en ovocitos de *Xenopus laevis* en los cuales se han microinyectado los cARNm que codifican para las diferentes subunidades de los R-nic musculares o los neuronales  $\alpha 2p4$ , o bien la microinyección del ARNm total del órgano eléctrico de *Torpedo californica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Soluciones

- De Barth (en mM): 88 de NaCl; 1 de KCl; 0.33 de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 0.41 de  $\text{CaCl}_2$ ; 0.82 de  $\text{MgSO}_4$ ; 2.4 de  $\text{NaHCO}_3$  y 5 de HEPES (ajustado a pH 7.4 con NaOH), adicionado con 0.1 mg/ml de sulfato de gentamicina (García-Colungay Miledi; 1996, 1997a).
- De registro: la solución interna en ambos microelectrodos fue KCl a una concentración de 3 M. La solución externa utilizada fue la de Ringer normal, la cual consiste (en mM): 115 de NaCl; 2 de KCl; 1.8 de  $\text{MgCl}_2$  y 5 de HEPES, ajustada a pH 7.4 con NaOH (Grassi y col, 1993; García-Colunga y Miledi, 1996 y 1997a).

### Reactivos

Los inhibidores de los sistemas de recaptura de monoaminas se obtuvieron en RBI (Natic, MO, USA), y los demás reactivos en Sigma (St. Louis, MO, USA).

## Material biológico

La extracción del ARNm del órgano eléctrico del *Torpedo californica*, así como la transcripción *in vitro* realizada para la obtención del cARNm de las diferentes subunidades con las que se inyectaron los ovocitos se describen en el Anexo.

Los ovocitos se obtuvieron de ranas hembras maduras de la especie *Xenopus laevis*, adquiridas en Nasco (Fort Atkinson, WI. USA) y mantenidas en condiciones de bioterio. Para obtener los ovocitos, los animales fueron anestesiados, y luego se colocaron en una caja con agua y hielo (en proporción 1:1); después de 15-20 minutos estuvieron en condiciones de someterse a la cirugía. Los animales se fijaron en una superficie limpia en posición decúbito dorsal. Se realizó un corte en la piel de ~ 1 cm en diagonal a la línea media de la región abdominal. Se disecaron los planos musculares hasta visualizar el ovario, el cual se incidió para la obtención de los ovocitos. Éstos fueron retirados junto con el tejido conectivo que los mantiene unidos, y luego se les transfirió a una caja de Petri con solución de Barth y gentamicina. Se conservaron en una incubadora a 16 °C hasta que fueron seleccionados. Concluida la obtención de ovocitos, se suturaron los planos musculares del animal mediante puntos separados sobre las fascias musculares y posteriormente la piel. Los animales se mantuvieron en una caja hasta su recuperación y después se reintegraron a la colonia.

Los ovocitos fueron disgregados manualmente hasta tener células individuales. Después se seleccionaron ovocitos sin daño externo aparente, en estados V y VI de acuerdo con la clasificación de Dumont, los cuales se

caracterizan por ser los de mayor tamaño y presentar una definición clara y homogénea de los hemisferios animal (de color pardo oscuro) y vegetal (color amarillo claro) [Soreq y Seidman, 1992].

### *Microinyección*

Un día después de su obtención, los ovocitos fueron microinyectados con ARNm total (50 ng/50  $\mu$ l de agua) del órgano eléctrico de *Torpedo californica*, o una mezcla de cARNm (0.5-50 ng/50  $\mu$ l de agua) de las subunidades musculares a1, (31, y y 5 de ratón, o de las subunidades neuronales de a2 y p4 de rata [Grassi *et al*, 1993; García-Colunga y Miledi; 1996; 1997a].

La microinyección se realizó bajo un microscopio estereoscópico, de la siguiente forma: los ovocitos fueron transferidos con un poco de solución de Barth (a temperatura ambiente) a una caja de Petri en cuyo fondo tiene una malla fija de nylon de 500  $\mu$ m que sirve para la inmovilización del ovocito. Se utilizó un microinyector (*nanoliter injector*, Word Precisión Instruments Inc.). La inyección del material genético fue realizada en el polo vegetal del ovocito.

Las micropipetas de inyección fueron preparadas en un estirador de pipetas (Sutter P-30) con capilares de vidrio (Drumond Scientific Corp. Cat 3-666-216G) estériles y pulidos, con diámetros externos en la punta de  $\sim$  15-20  $\mu$ m. Después de la microinyección, los ovocitos se mantuvieron en viales con solución de Barth con gentamicina (renovada diariamente) en grupos de 10-15, en una incubadora a 16 °C.

Dos días después de la microinyección, la capa folicular que envuelve a los ovocitos fue removida mediante un tratamiento enzimático de colagenasa

tipo 1A (140 U/ mi) en solución de Ringer, durante 0.5-1 h [Miledi y Woodward, 1989]. Posteriormente, los ovocitos se lavaron varias veces con solución de Barth y se incubaron a 16 °C en una solución de Barth con gentamicina (renovada diariamente), hasta que fueron utilizados en los ensayos de electrofisiología (de tres a nueve días después de haber sido microinyectados).

### *Registros electrofisiológicos*

Los registros de las corrientes iónicas se llevaron a cabo mediante la técnica de fijación de voltaje (*Voltage Clamp*) con dos microelectrodos [Miledi, 1982]. Los microelectrodos se elaboraron con capilares de borosilicato con microfilamento y diámetro externo de 1.5  $\mu\text{m}$  (Word Precisión Instruments Inc.), cuya resistencia final fue de 0.5-2 MQ. El ovocito se colocó en una cámara de registro (0.1 mi), y las soluciones externas de Ringer normal, Ringer normal más AcCo, Ringer normal más tratamiento y Ringer normal más AcCo y tratamiento, se aplicaron mediante un sistema de perfusión continua (7-10 mi/ min). Los tratamientos consistieron en la aplicación de los compuestos: imipramina, 6-nitro-quipazina, clorimipramina, trazodona, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina y zimelidina, con diferentes concentraciones y tipos de aplicación. Las estructuras químicas de tales compuestos se muestra en la Figura 8.

A menos que se indique otro voltaje, los ovocitos se mantuvieron a un potencial de membrana de -60 mV (a través de un amplificador comercial (Warner OC-725A; Warner Instruments, Corp.). La corriente se indujo con AcCo, y dicha respuesta se denota como I-AcCo en las siguientes secciones de

este trabajo. Los pulsos de voltaje se realizaron y controlaron con el programa PClamp versión 5.5 (Axon Instruments, Inc.) y fueron enviados al amplificador, mediante una interfase DMA TL-1 (Axon Instruments, Inc.) conectada a una computadora PC, con una tarjeta Lab Master DMA (Scientific Solutions, Inc.). Los registros obtenidos en el osciloscopio (Nicolet 310, Nicolet Instruments) fueron grabados directamente en discos y luego fueron analizados con un programa elaborado por Rico Miledi y con el programa comercial Orígin 4.1 (Microcal Software, Inc.).

Las relaciones concentración-respuesta para la inhibición de la I-AcCo por el fármaco (imipramina o clorimipramina) se obtuvieron ajustando los datos a la ecuación de Hill:

$$I_{\text{fármaco}} = I_p * IC^{nH} / (I_{\text{fármaco}}^{nH} + IC^{nH}) \quad (1)$$

Donde  $I_{\text{fármaco}}$  es la amplitud de la I-AcCo resistente a la inhibición del fármaco,  $I_p$  es la corriente control máxima,  $IC_{50}$  es la concentración del fármaco que inhibe la mitad de la respuesta control máxima, y  $nH$  es el coeficiente de Hill.

Las relaciones concentración-respuesta para la AcCo sola o AcCo más el fármaco se obtuvieron ajustando los datos a la ecuación de Hill:

$$I_{\text{AcCo}} = I_{\text{max}} * [AcCo]^{nH} / ([AcCo]^{nH} + EC_{50}^{nH}), \quad (2)$$

Donde  $I_{\text{AcCo}}$  es la amplitud de la corriente dependiente de la concentración de AcCo,  $I_{\text{max}}$  es la amplitud de la I-AcCo control,  $EC_{50}$  es la concentración de AcCo que produce la mitad de la respuesta máxima, y  $nH$  es el coeficiente de Hill.

Para determinar si la imipramina o la clorimipramina se unen con los R-nic dentro del canal iónico se aplicó un modelo de un sitio de unión [Woodwul, 1973; García-Colunga y Miledi, 1996]. Este modelo asume que el bloqueo causado por el fármaco es rápido; que la dependencia del voltaje del sitio de unión del fármaco dentro del canal iónico está relacionada con la distancia eléctrica de ese sitio de unión, medido desde el lado extracelular del canal y está dado por la ecuación siguiente:

$$IC_{50}(V_m) = IC_{50}(0) \exp(dzFV_m / RT), \quad (3)$$

Donde la  $IC_{50}(0)$  es la concentración del fármaco que bloquea la mitad de la respuesta a 0 mV,  $V_m$  es el voltaje aplicado a la membrana,  $d$  es la fracción del campo eléctrico *sensado* en el sitio de unión de la imipramina o clorimipramina dentro del canal iónico,  $z$  es la valencia de la molécula bloqueadora,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la contante de los gases, y  $T$  es la temperatura absoluta. Combinando la ecuación (3) con la ecuación de Hill para el bloqueo (1), tenemos:

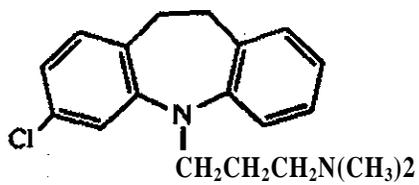
$$I_{-AcCo} / I_{fármaco} - 1 = [fármaco] / IC_{50} * \exp(dzFV_m / RT) \quad (4)$$

La ecuación (4) fue linearizada para ajustar los datos en un intervalo de voltajes de -140 a -40 mV.

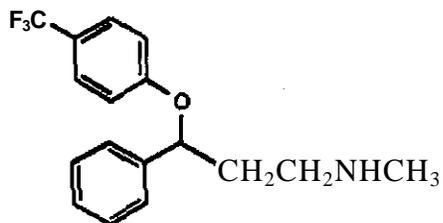
El curso temporal del decaimiento de la I-AcCo se ajustó con la función:

$$I(t) = I_o + A_f \exp(-t/x_f) + A_s \exp(-t/T_s), \quad (5)$$

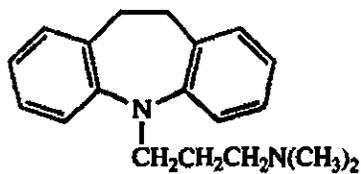
Donde  $I(t)$  es la corriente en el tiempo  $t$ ,  $I_o$  es el componente asintótico,  $A_f$  y  $A_s$  son las amplitudes para los componentes rápido y lento, y  $x_f$  y  $x_s$  son sus respectivas constantes de tiempo.



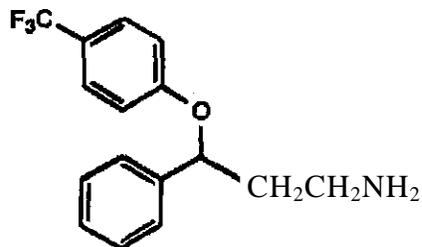
Clorimipramina



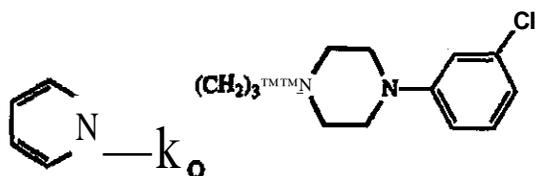
Fluoxetina



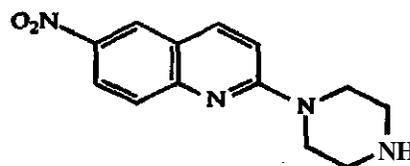
Imipramina



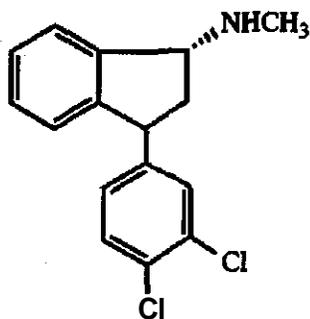
Norfluoxetina



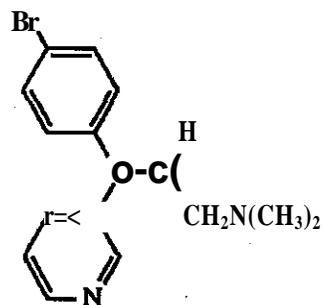
Trazodona



6-nitro-quipazina



Indatralina



Zimelidina

Figura 8. Estructuras químicas de los compuestos usados en este trabajo. Clorimipramina; fluoxetina; imipramina; norfluoxetina (metabolito activo de fluoxetina); trazodona; 6-nitro-quipazina; indatralina y zimelidina.

## RESULTADOS

Debido a que se ha reportado que los ovocitos expresan ocasionalmente receptores muscarínicos de AcCo [Kusano *et al.*, 1977] se aplicó AcCo (100  $\mu$ M) a varios ovocitos de cada lote no inyectados con material genético. Aquellos lotes en los que los ovocitos mostraron alguna respuesta muscarínica no fueron utilizados. Además, también se aplicaron los diferentes fármacos solos (a concentraciones mayores de 10  $\mu$ M) para evaluar un posible efecto, tanto en ovocitos sin inyectar como en aquellos que expresaron R-nic de *Torpedo*, muscular y  $\alpha_2\beta_4$ . En ningún caso se observó respuesta alguna.

El efecto de los inhibidores del sistema de recaptura de monoaminas, imipramina, 6-nitro-quipazina, trazodona, clorimipramina, indatralina, norfluoxetina, fluoxetina y zimelidina, se evaluó en los R-nic de *Torpedo*, muscular y neuronal  $\alpha_2\beta_4$ . La I-AcCo fue inducida con bajas concentraciones de AcCo, y después de que la respuesta control alcanzó su nivel máximo se coaplicaron AcCo y el fármaco a una concentración de 10  $\mu$ M. Posteriormente, el fármaco se retiró, dejando al ovocito expuesto a la AcCo para permitir la recuperación de la I-AcCo (ver Figuras 9A y 9B).

El efecto de cada fármaco se determinó por la amplitud de I-AcCo más el fármaco, sobre la inducida por AcCo sola, al tiempo en el que el fármaco se retiró, obteniendo así la fracción de la corriente resistente al efecto del fármaco.

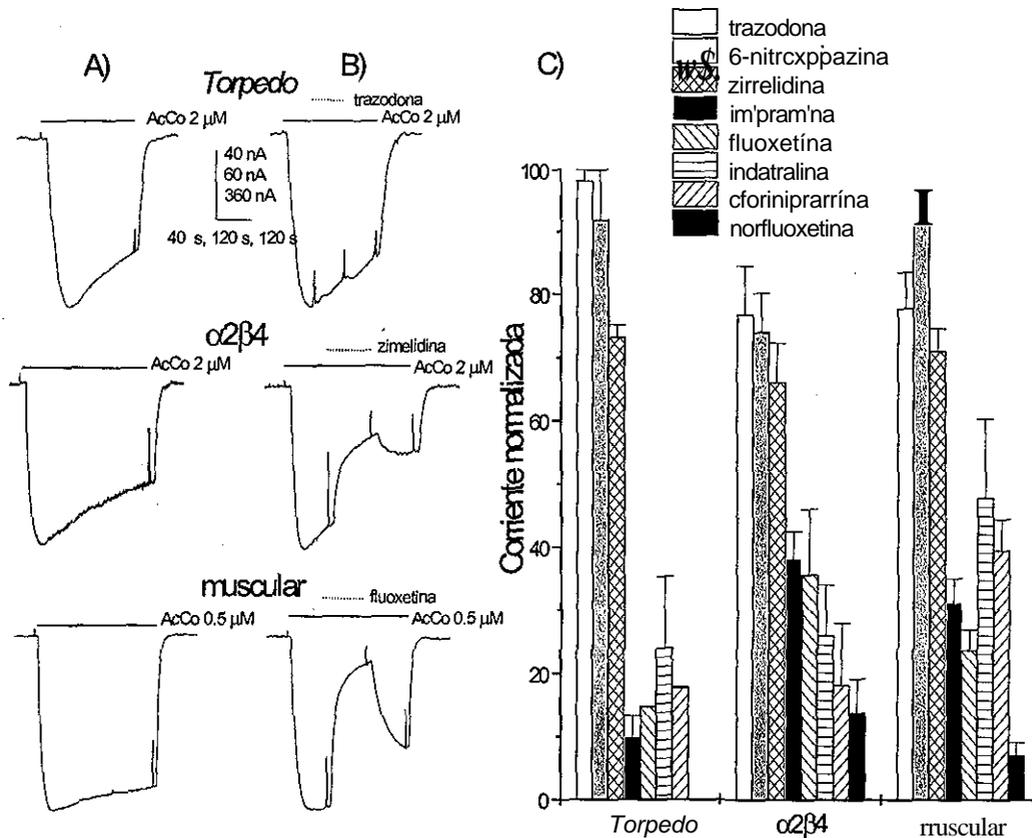


Figura 9. Efecto de los ISRM sobre la 1-AcCo. A) Registros representativos de las respuestas control, en los diferentes subtipos de R-nic. B) Registros representativos del efecto de los diferentes compuestos sobre los diferentes subtipos de R-nic, obtenidos en los mismos ovocitos mostrados en A. Encima de cada registro se muestra el compuesto o compuestos aplicados, así como su concentración. Las barras encima de estos registros y en los subsecuentes representan el tiempo de aplicación. C) La altura de las columnas representa el promedio más el EEM de la fracción de corriente persistente al final de la aplicación de 10  $\mu$ M de los diferentes ISRM. El número de ovocitos registrados fue: *Torpedo* n = 3-6; neuronales  $\alpha$ 2p4 n = 4-10 y n = 4-7 musculares.

Los resultados muestran que los compuestos usados en este trabajo reducen la I-AcGo con diferente potencia. Conforme a su potencia inhibitoria en los diferentes subtipos de R-nic, los compuestos pueden reunirse en dos grupos: A) Inhibidores débiles (inhibición < 50%), que incluyen: trazodona, 6-nitro-quipazina, y zimelidina. Estos fármacos inhibieron la corriente inducida

por AcCo en R-nic de *Torpedo* en 2-26% (n = 3), en los del subtipo neuronal en 23-34% (n = 4-6) y en el muscular en 8-28% (n = 5). B) Inhibidores potentes (inhibición > 50%), formados por indatralina, clorimipramina, imipramina, fluoxetina y norfluoxetina. Con estas sustancias (excepto norfluoxetina en R-nic de *Torpedo*) el porcentaje de inhibición fue de: 76-90% (n = 3-6) para R-nic *Torpedo*, 62-86% (n = 4-10) para el neuronal  $\alpha 2p4$ , y 52-93% (n = 5) para el muscular. El porcentaje de la I-AcCo resistente a cada fármaco en los diferentes R-nic se muestran en la Figura 9C.

El porcentaje de recuperación de la corriente muestra una relación con la potencia de inhibición, de tal manera que los ovocitos expuestos a fármacos con una potencia de inhibición menor, muestran un mayor porcentaje en la recuperación de la corriente, que aquellos expuestos a fármacos con una mayor potencia inhibitoria.

Después de esta breve exploración, el estudio se enfocó a evaluar en primera instancia los efectos de la imipramina, debido a que esta sustancia es un fármaco de referencia entre los antidepresivos [Garattini *et al*, 1998].

### **Efectos de la imipramina en los R-nic**

Se realizaron diversos protocolos experimentales para evaluar con mayor detalle los efectos de la imipramina en los R-nic de *Torpedo*, neuronales  $\alpha 2(34$  y musculares, haciendo mayor énfasis en los dos últimos subtipos.

## **Inhibición de la corriente inducida por AcCo por efecto de la imipramina**

Para conocer la relación entre la concentración de la imipramina y el porcentaje de inhibición de la I-AcCo se realizaron curvas concentración-respuesta, en ausencia y presencia del fármaco. La coaplicación de una concentración constante de AcCo con diferentes concentraciones de imipramina produjo una disminución variable y rápida de la corriente (Fig. 10A). El porcentaje de inhibición y el nivel de recuperación dependieron de la concentración de imipramina aplicada y del subtipo de R-nic.

Los porcentajes de la corriente resistente a la inhibición por diferentes concentraciones de la imipramina fueron ajustados con la ecuación 1, la cual nos proporciona la concentración de imipramina que inhibe 50% de la respuesta ( $IC_{50}$ ), y el coeficiente de Hill (nH), que indica el número de posibles sitios de unión del fármaco en el receptor. Las  $IC_{50}$  que se obtuvieron fueron de  $0.66 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (n = 3-7) para los R-nic de *Torpedo*,  $3.65 \pm 0.3 \mu\text{M}$  (n = 5-11) para los R-nic neuronales  $\alpha 2(34$  y  $5.57 \pm 0.19 \mu\text{M}$  (n = 4-7) para los musculares. Los nH fueron de  $0.86 \pm 0.11$ ,  $0.73 \pm 0.04$  y  $1.2 \pm 0.03$  para los R-nic de *Torpedo*, neuronales  $\alpha 2(34$  y musculares, respectivamente (Fig. 10B). De este modo, la imipramina inhibe con mayor potencia a los R-nic de *Torpedo* que a los neuronales o a los musculares. Además, conforme a los nH obtenidos en los diferentes receptores estudiados aquí, la imipramina parece interactuar con el receptor en un solo sitio.

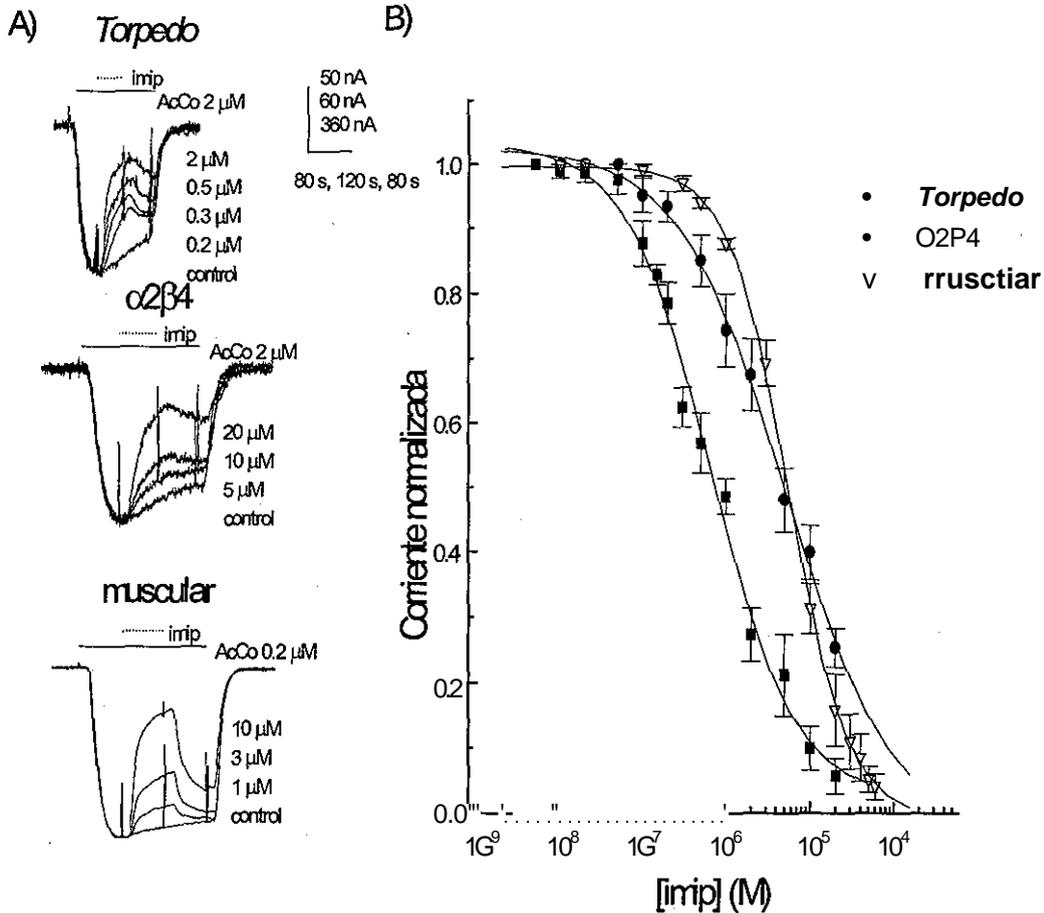


Figura 10. Relación concentración-res puesta de la imipramina. A) Registros superpuestos representativos de la 1-AcCo sola y aquellos producidos por la coaplicación con diferentes concentraciones de imip en los R-nic de *Torpedo* (superior), neuronal  $\alpha 2\beta 4$  (centro) y muscular (inferior). B) La relación concentración-respuesta de inhibición de la imip en ios tres subtipos de R-nic. Las respuestas en presencia de imip fueron normalizadas con respecto a las respuestas controles máximas. Las líneas continuas fueron obtenidas ajustando los datos con la ecuación 1. El número de ovocitos registrados fue:  $n \approx 3-7$  para los de *Torpedo*,  $n = 5-11$  para ios neuronales  $\alpha 2\beta 4$ , y  $n = 4-7$  para los musculares. En esta figura y en las siguientes, imipramina está abreviada como imip.

## **Tipo de inhibición**

Para conocer si la imipramina inhibe la respuesta de los R-nic al ocupar el sitio de unión de la AcCo, se realizaron curvas concentración-respuesta. En todos los casos la concentración de imipramina se mantuvo constante y la de AcCo se incrementó para obtener una relación concentración-respuesta. Además, se examinaron dos formas de aplicación de la imipramina en ovocitos que expresaron R-nic neuronales  $\alpha 2(34$  y musculares para conocer si la forma de aplicar el fármaco modifica la respuesta. En la primera forma de aplicación los ovocitos fueron perfundidos simultáneamente con AcCo e imipramina, y en la segunda, fueron expuestos durante 2 minutos a imipramina y después perfundidos simultáneamente con AcCo e imipramina. Las curvas obtenidas para ambos subtipos de receptores con los procedimientos antes mencionados (Figs. HA y 11B), muestran que la inhibición provocada por la imipramina no es superada por el incremento en la concentración de AcCo. Además, el porcentaje de inhibición fue independiente de la concentración de AcCo. Todo esto sugiere que la imipramina presenta una inhibición no competitiva.

Por otra parte, la inhibición de la corriente causada por la preincubación con imipramina fue mayor que cuando se aplicaron simultáneamente la AcCo e imipramina (Figs. 11A y 11B y Tabla 8), por lo que se procedió a evaluar más detalladamente si diferentes formas de aplicación producían distintos porcentajes de inhibición de corriente.

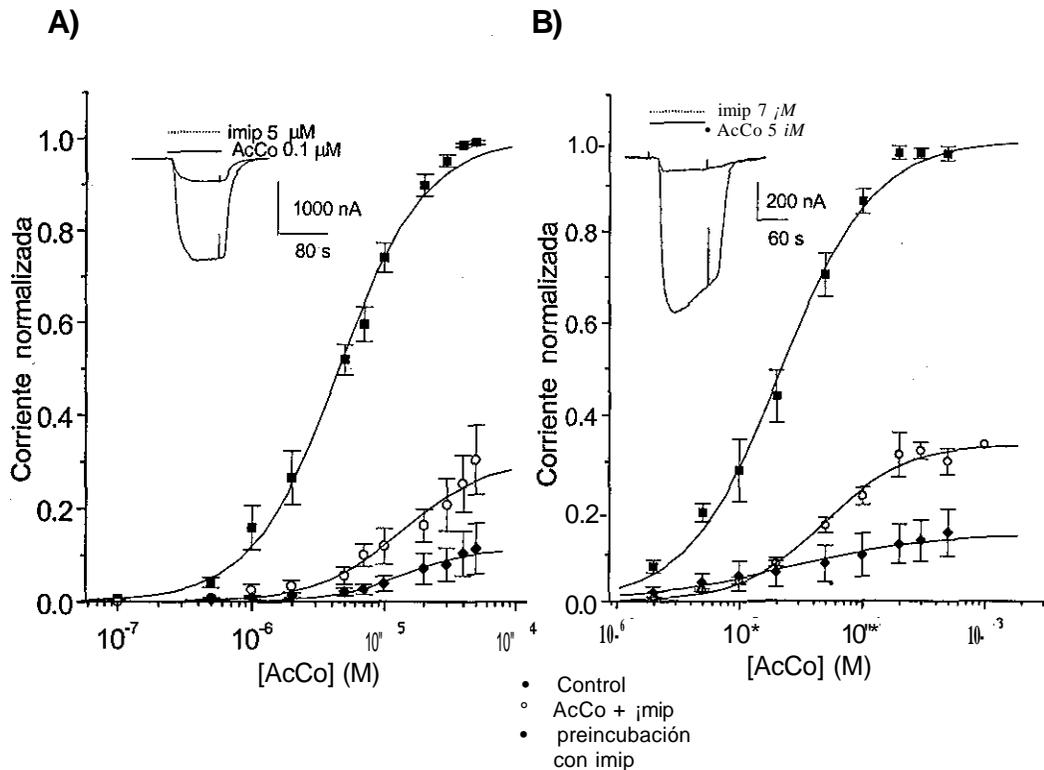


Figura 11. Inhibición de la imip en R-nic neuronales  $\alpha 2p4$  y musculares. La relación concentración-respuesta se obtuvo aplicando AcCo sola y AcCo más imip en R-nic neuronales  $\alpha 2p4$  (A) y musculares (B). La imip se aplicó antes o simultáneamente con la AcCo (AcCo + imip o preincubación con imip respectivamente). Los datos fueron normalizados a las respuestas control máximas de AcCo y ajustadas con la ecuación 2. Los insertos muestran registros superpuestos representativos de la l-AcCo control y aquellos obtenidos con la coaplicación de AcCo e imip. El número de ovocitos para los R-nic neuronales  $\alpha 2$  (34 fue  $n = 4-9$  y para los R-nic musculares fue de  $n = 5-10$  (Tabla 8).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 8. Concentraciones efectivas 50% (EC50) y coeficientes de Hill (nH), de AcCo sola y con imipramina en R-nic neuronales  $\alpha 2p4$  y musculares.**

**Imip = imipramina.**

Tipo de aplicación	EC <sub>50</sub> ( $\mu M$ )	nH
R-nic neuronales $\alpha 2p4$		
AcCo sola	26.8 ± 2.4(n = 9)	1.2 ± 0.1
AcCo + 7 $\mu M$ imip	53.4 ± 4.1(n = 5)	1.4 ± 0.3
Preincubación con 7 $\mu M$ imip	48.2 ± 1.4(n = 4)	0.9 ± 0.2
R-nic musculares		
AcCo sola	5.3 ± 0.3(n=10)	1.1 ± 0.1
AcCo + 5 $\mu M$ imip	13.6 ± 1.3 (n=5)	1.3 ± 0.2
Preincubación con 5 $\mu M$ imip	13.8 ± 1.2(n = 5)	1.6 ± 0.2

### Diferentes formas de aplicación de imipramina

Se realizaron una serie de experimentos para explorar el efecto causado por la imipramina en los R-nic neuronales  $\alpha 2P4$  y musculares, al ser aplicada en cuatro formas diferentes: (D el ovocito fue preincubado con imipramina y después se indujo la corriente con AcCo sola (Fig. 12A); (D después de inducir la corriente con AcCo, se coaplicaron AcCo e imipramina (Fig. 12B); (D la AcCo y la imipramina se aplicaron simultáneamente (Fig. 12C); (D los ovocitos se preincubaron con imipramina e inmediatamente después se coaplicaron imipramina y AcCo (Fig. 12D). Los resultados de estos experimentos muestran que cuando la imipramina se aplicó antes que la AcCo (Fig. 12A), la inhibición de la corriente fue similar a aquellas obtenidas cuando fue coaplicada (Figs. 12B y 12C). Por otra parte, cuando el ovocito fue

preincubado con imipramina seguido de la coaplicación con AcCo e imipramina, la inhibición fue mayor (Fig. 12D y Tabla 9). Partiendo de estos resultados, es posible sugerir que la imipramina interactúa con ambos subtipos de R-nic, tanto en la conformación activa como en la de reposo.

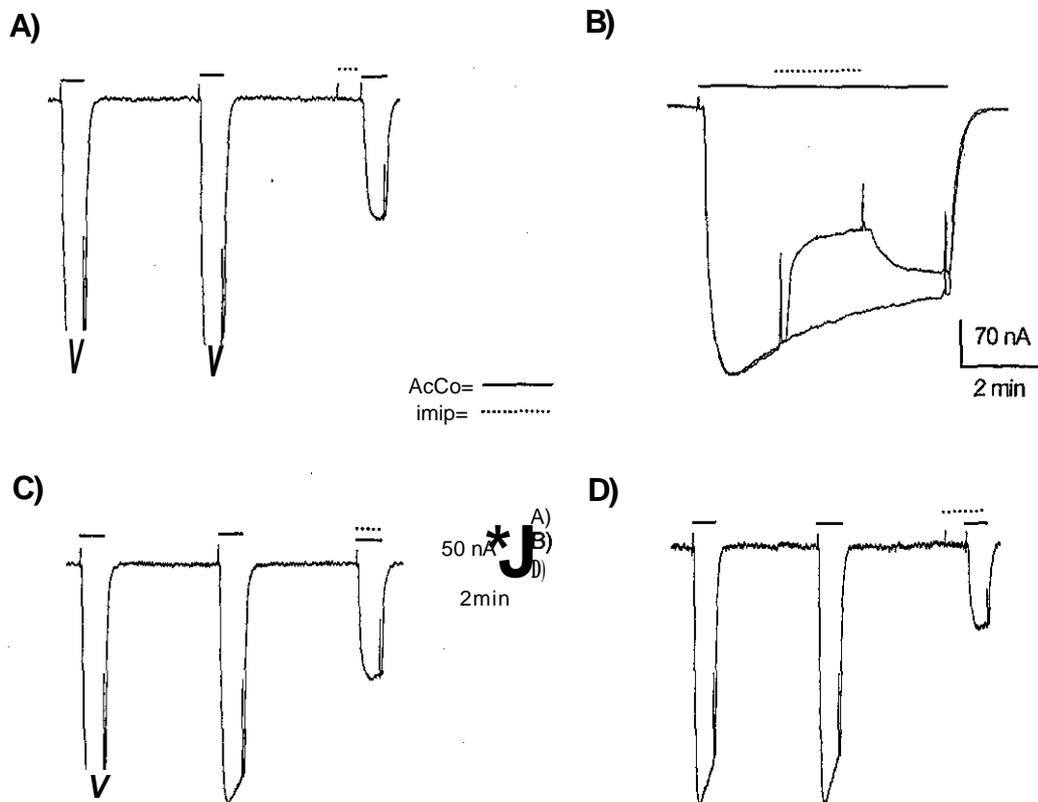


Figura 12. **Diferentes formas de aplicación de imip en R-nic.** Como ejemplo se muestran las diferentes formas de aplicación en ovocitos que expresaron R-nic musculares. Las I-AcCo controles fueron producidas por la aplicación de  $0.5 \mu\text{M}$  de AcCo sola y después se aplicaron  $5 \mu\text{M}$  de imip en diferentes formas. Los ovocitos fueron preincubados con imip y después se aplicó AcCo sola (A); la imip se aplicó en presencia continua de AcCo después de que se alcanzó la respuesta máxima (B); se coaplicaron simultáneamente AcCo e imip (C); se preincubó con imip e inmediatamente después se coaplicó con AcCo (D). El número de ovocitos registrados fue  $n = 5-7$  para los R-nic neuronales  $\alpha 2\text{p}4$  y  $n = 4$  para los R-nic musculares (Tabla 9).

**Tabla 9. Porcentaje de I-AcCo resistente en las diferentes formas de aplicación de la imipramina.**

Tipo de aplicación	R-nic neuronales α2P4	R-nic muscular
(D imip, AcCo	42.6 ± 8.3 (n = 6)	42.8 ± 2.7 (n = 4)
© AcCo, AcCo + imip, AcCo	48.9 ± 4.8 (n = 5)	44.2 ± 4.5 (n = 4)
® AcCo + imip	56.9 ± 7.5 (n = 7).	51.1 ± 6.5 (n = 4)
© imip, AcCo + imip	70.6 ± 3.8 (n = 6)	71.7 ± 1.7 (n = 4)

La corriente en los R-nic musculares fue inducida por la aplicación de 0.5  $\mu$ M de AcCo e inhibida con 5  $\mu$ M de imip, y en el R-nic neuronales α2P4 con 5  $\mu$ M de AcCo y con 4  $\mu$ M de imip. Los datos muestran la respuesta normalizada promedio ± el EEM.

### **Efecto del voltaje en la inhibición**

Para determinar si la imipramina está interactuando dentro del canal iónico o externamente en los R-nic neuronales α2P4 y musculares, se estudió la inhibición de la corriente inducida por AcCo como una función del potencial de membrana. La Figura 13A muestra el efecto típico de 10  $\mu$ M de imipramina en la corriente inducida por 0.5  $\mu$ M de AcCo en un ovocito que expresó R-nic musculares. Se aplicaron pulsos a diferentes voltajes (de -140 a 40 mV en incrementos de 20 mV) a partir de un potencial de membrana de -60 mV, antes, durante la aplicación de AcCo sola y con AcCo más imipramina.

Los resultados de estos experimentos se analizaron usando el modelo de un solo sitio de bloqueo [Woodhull, 1973; García-Colunga y Miledi, 1996], que permite calcular la distancia eléctrica correspondiente a la fracción del

campo eléctrico que es *sensado* en el sitio de unión de la imipramina, si éste se localiza dentro del canal iónico (Fig. 13B).

La corriente producida por la AcCo en presencia de imipramina ( $I_{\text{miip}}$ ) fue comparada con la corriente control ( $I_{\text{ACCO}}$ ) en cada potencial de membrana. El bloqueo de la corriente inducida por AcCo, debido al efecto de la imipramina, dependió ligeramente del voltaje en R-nic neuronales  $\alpha_2(34$  y musculares.

En los ovocitos con R-nic neuronales  $\alpha_2(34$  la distancia eléctrica fue de  $0.10 \pm 0.02$  (n = 7) y en los ovocitos con R-nic musculares fue de  $0.12 \pm 0.02$  (n = 6), lo que indica, en ambos casos, que la imipramina interactúa en el poro del complejo receptor-canal, en la vecindad de la porción extracelular. Por otra parte, la concentración de imipramina que inhibe la mitad de la respuesta a 0 mV, la  $IC_{50}$ , fue de  $1.21 \mu\text{M}$  para los ovocitos con R-nic neuronales  $\alpha_2(34$  y de  $3.61 \mu\text{M}$  para los R-nic musculares. Estos valores son menores a aquellos obtenidos a -60 mV. Las Figuras 13C y 13D muestran las relaciones corriente-voltaje para los R-nic neuronales  $\alpha_2(34$  y para los musculares.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

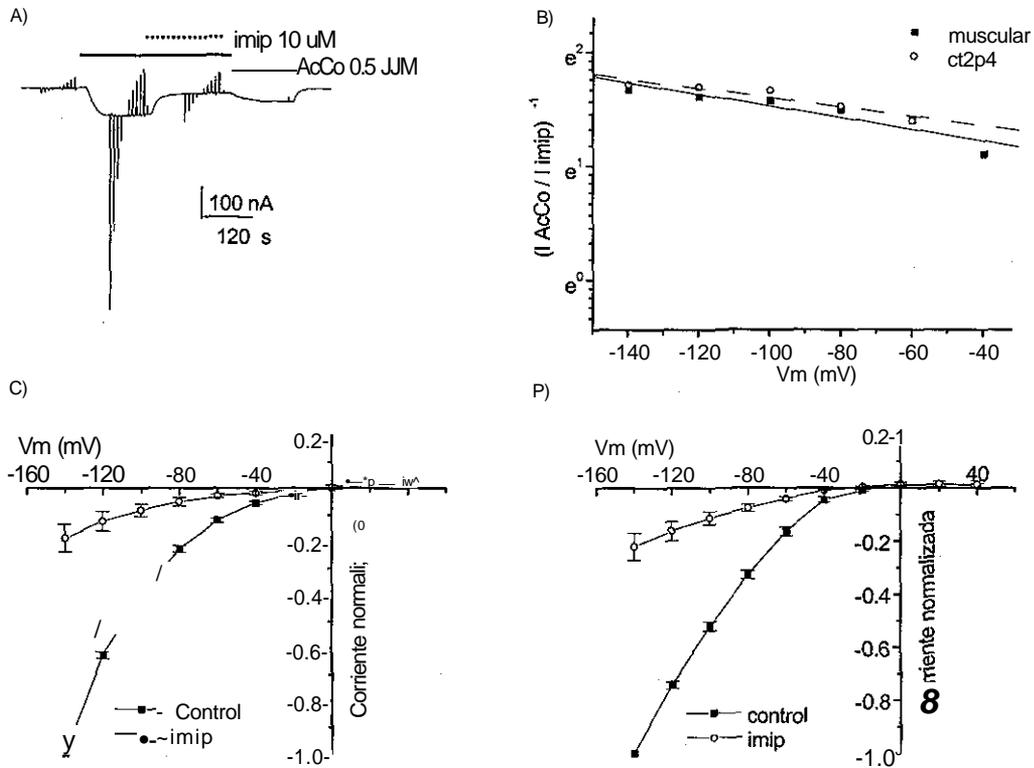


Figura 13. Dependencia al voltaje de la inhibición de la 1-AcCo, por efecto de la imip. A) Registros representativos de la respuesta producida por la aplicación de AcCo sola y de la inhibición producida por la imip en R-nic musculares. Los potenciales de membrana se mantuvieron a -60 mV, y a partir de éste se aplicaron pulsos de 20 mV, desde -140 a 40 mV, en los ovocitos con solución de Ringer, AcCo y AcCo más imip. B) Inhibición por imip de la 1-AcCo en función de potencial de la membrana en R-nic neuronales a2p4 y musculares. Las líneas continuas fueron obtenidas al ajustar los datos a un modelo de bloqueo de un solo sitio de unión, usando la ecuación (4). C) Relación corriente-voltaje de AcCo en ausencia y presencia de imip en R-nic neuronales cc2p4 y musculares. D) Las 1-AcCo con y sin imip fueron normalizadas a la respuesta control obtenida a -140 mV. El número de ovocitos registrados fue de  $n \approx 7$  para el R-nic neuronales a2p4 y  $n = 6$  para los musculares.

### Efecto de la imipramina en el decaimiento de la corriente

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los cambios en el decaimiento de la corriente inducidos por la imipramina fueron estudiados en ovocitos que expresaron R-nic neuronales a2|34 y

musculares. La corriente control se indujo con 100  $\mu$ M (R-nic neuronales  $\alpha$ 2P4) o 5  $\mu$ M AcCo (R-nic musculares). En ambos subtipos de R-nic, en presencia continua de la AcCo, la corriente control alcanzó su pico y después declinó. Este decaimiento de la corriente es debido principalmente a la desensibilización de los receptores [Katz y Thesleff 1957]. Cuando la AcCo fue coaplicada con 7  $\mu$ M (R-nic neuronales  $\alpha$ 2(34) o 10  $\mu$ M (R-nic musculares) de imipramina, el pico de la corriente ( $I_{piCo}$ ) fue sustancialmente reducido y el decaimiento de la corriente se aceleró (Fig. 14).

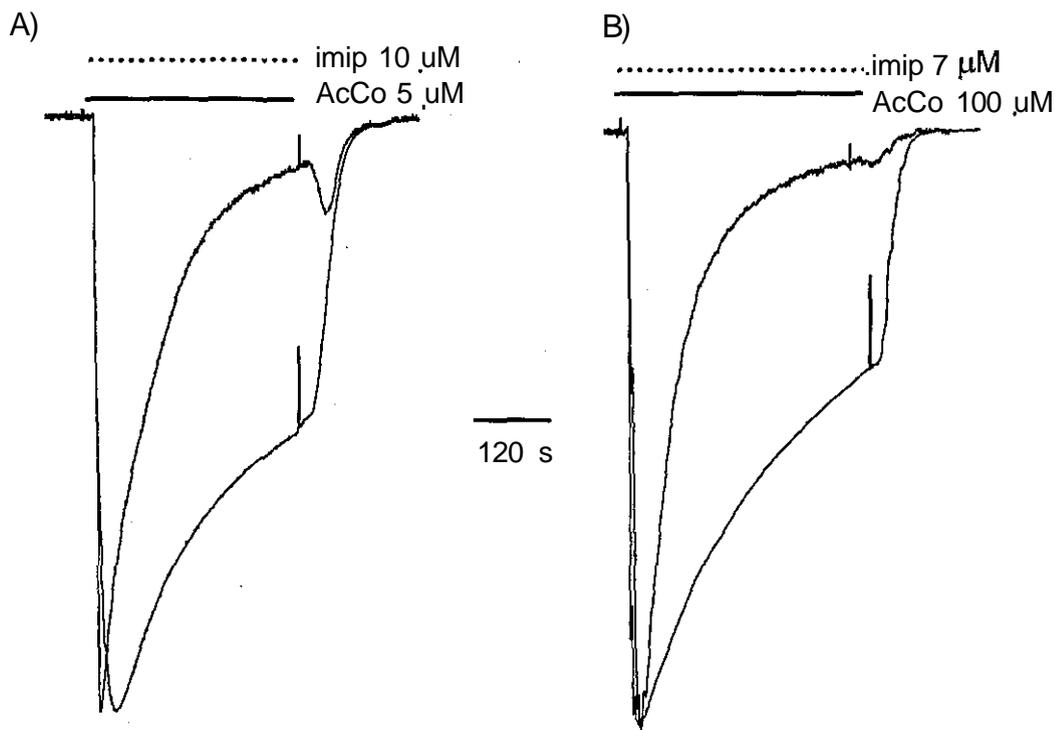


Figura 14. **La imip acelera el decaimiento de la 1-AcCo.** Los registros de la respuesta control y aquellos obtenidos en presencia de imip en los R-nic neuronales  $\alpha$ 2p4 (A) y musculares (B) se muestran normalizados y superpuestos. Las respuestas controles fueron 5.12  $\mu$ A (A) y 54.6  $\mu$ A (B); mientras que en presencia de imip fueron 1.34  $\mu$ A (A) y 11.5  $\mu$ A (B). El número de ovocitos estudiados que expresaron R-nic neuronales  $\alpha$ 2p4 fue de  $n = 4$  y para los R-nic musculares fue de  $n = 6$  (Tabla 10).

El decaimiento de la corriente en ausencia y presencia de imipramina se analizó de dos formas:

1) se comparó la fracción de la corriente que disminuyó al final de la aplicación, con respecto a la corriente máxima en el mismo registro, es decir, con su propio pico de corriente ( $D_{\bar{n}}$ ) obtenida con AcCo sola o con AcCo + imipramina. En ambos subtipos de receptores, la disminución de la corriente fue mayor debido a la presencia de la imipramina (Tabla 10).

2) la tasa de decaimiento en presencia o ausencia de imipramina fue ajustada con funciones exponenciales. El decaimiento de la corriente inducida por AcCo sola se ajustó a una función exponencial, mientras que en presencia de imipramina se ajustó a la suma de dos funciones exponenciales. En los dos subtipos de receptores, las dos constantes de tiempo del decaimiento de la corriente en presencia de imipramina fueron más rápidas que las de los controles (Tabla 10). Adicionalmente, se observó una corriente de cola transitoria cuando se lavaron la AcCo y la imipramina. Tal efecto se obtuvo con concentraciones altas de AcCo y fue más evidente en los R-nic neuronales  $\alpha 2p4$  que en los musculares (Fig. 14). Este proceso ha sido atribuido a la reversión del bloqueo de la AcCo del canal abierto [Dilger y Lui, 1992; Lester y Dani, 1995; García-Colunga y Miledi, 1995]. Sin embargo, cuando a la solución de lavado se le aplicó imipramina, la corriente de cola no se observó, lo que sugiere que dicha corriente se debe posiblemente a la reversión del bloqueo de la imipramina, de forma similar a lo que ocurre con la 5-HT y la atropina [García-Colunga y Miledi, 1995; Zwarty Vijverberg, 1997].

**Tabla 10. Amplitudes y constantes de tiempo de los componentes del decaimiento de la corriente en R-nic neuronales  $\alpha 2\beta 4$  y musculares.**

Parámetros	R-nic neuronales $\alpha 2\beta 4$ (n = 4)		R-nic musculares (n = 6)	
	100 $\mu$ M AcCo	100 $\mu$ M AcCo + 10 $\mu$ M imip	5 $\mu$ M AcCo	5 $\mu$ M AcCo + 10 $\mu$ M imip
%/pto. *(nA)	2 860 $\pm$ 681	756 $\pm$ 137	34 268 $\pm$ 15,028	8 967 $\pm$ 2 360
$D_{ft}$	0.62 $\pm$ 0.3	0.95 $\pm$ 0.8	0.36 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.03
$l_o$	0.18 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.00	0.45 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.04
$A$	0.83 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.08	0.60 $\pm$ 0.11
$T_r$ (s)	220.2 $\pm$ 30.8	47.46 $\pm$ 20.90	126.9 $\pm$ 23.0	52.5 $\pm$ 25.0
$A_i$	-----	0.41 $\pm$ 0.09	-----	0.39 $\pm$ 0.06
$T_i$ (s)	-----	84.85 $\pm$ 28.40	-----	95.2 $\pm$ 23.0

La amplitud promedio de 1-AcCo para los R-nic neuronales  $\alpha 2\beta 4$  fue de 5 127 nA, y para los musculares de 54 600 nA. Las amplitudes de los componentes rápidos ( $A_f$ ), lentos ( $A$ ) y asintóticos ( $l_o$ ) fueron normalizadas con la amplitud de la corriente total. La aplicación de AcCo e imip fue simultánea. Los valores en la Tabla son las respuestas normalizadas promedios y los EEM. El número de ovocitos estudiados se encuentra entre paréntesis.

### **Efecto de la clorimipramina sobre los R-nic $\alpha 2\beta 4$**

Debido a que la clorimipramina mostró un potente efecto inhibitorio sobre los R-nic y a que su estructura molecular es muy semejante a la de la imipramina, también se realizó una caracterización detallada de sus efectos en los R-nic neuronales  $\alpha 2\beta 4$ .

## Efecto de la clorimipramina sobre la corriente inducida por AcCo

Los protocolos experimentales utilizados para caracterizar el efecto de este fármaco son esencialmente los mismos que se describieron en la caracterización de la imipramina. Para conocer la relación entre la concentración del fármaco y porcentaje de inhibición de la corriente, se realizaron curvas concentración-efecto, aplicando diferentes concentraciones de clorimipramina y una concentración fija de AcCo. Además, se realizaron dos tipos de curvas para averiguar si la forma de aplicación de la clorimipramina produce resultados diferentes.

En la Figura 15 se muestran los dos protocolos usados. El primero (Fig. 15 A) consistió en inducir la corriente control, y una vez que alcanzó el pico de corriente, se coaplicó AcCo con clorimipramina; posteriormente se retiró el fármaco, para permitir la recuperación de la respuesta. En la segunda forma (Fig. 15B), los ovocitos se preincubaron con clorimipramina y después se coaplicaron AcCo y clorimipramina.

En ambos casos, la fracción de inhibición y el nivel de recuperación de la corriente dependieron de la concentración de clorimipramina. Con preincubación, la  $IC_{50}$  fue de  $1.26 \pm 0.23 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ), con un  $nH$  de  $0.78 \pm 0.11$ , y sin preincubación, la  $IC_{50}$  fue de  $1.54 \pm 0.33 \mu\text{M}$  ( $n = 3$ ) y el  $nH$  de  $0.85 \pm 0.15$  (Fig. 15C). De acuerdo con el  $nH$ , se puede sugerir que la clorimipramina interactúa con los R-nic neuronales  $\alpha 2p4$  en un solo sitio, y que aparentemente es necesaria la activación del receptor para que la clorimipramina ejerza su efecto, ya que la inhibición en ambos protocolos fue similar.

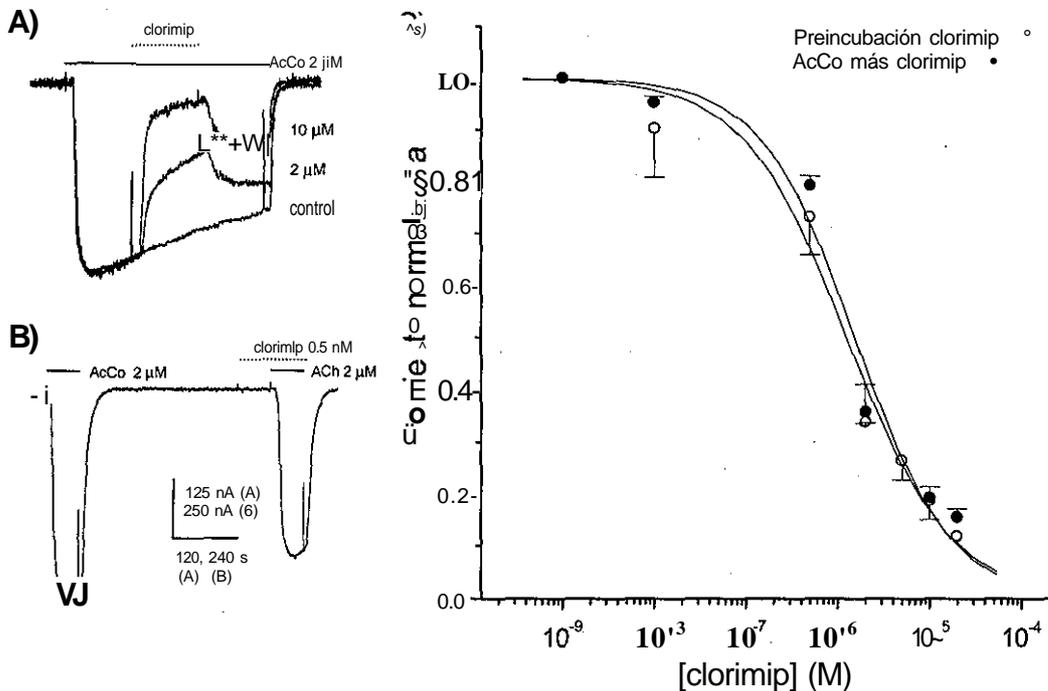


Figura 15. **Relación concentración-efecto de la clorimipramina.** A) Registros superpuestos de la I-AcCo control y en presencia de clorimipramina, a las concentraciones indicadas. B) Registros representativos de la I-AcCo control y aquellos obtenidos con la preincubación de los ovocitos con clorimipramina y después coaplicando AcCo y clorimip. C) Relaciones concentración-respuesta obtenidas cuando la clorimip se aplicó después de que la I-AcCo alcanzó su pico (círculos vacíos) o cuando los ovocitos fueron preincubados con clorimipramina (círculos llenos). En esta figura y en las siguientes la clorimipramina está abreviada como clorimip.

### Tipo de interacción de la clorimipramina con los R-nic

Para determinar si la clorimipramina se une en los R-nic neuronales  $\alpha 2J34$ , en los sitios de unión de AcCo se realizaron curvas concentración-respuesta en las cuales la concentración de clorimipramina se mantuvo constante, en tanto la concentración de AcCo fue incrementándose. En las curvas concentración-respuesta de AcCo más clorimipramina los ovocitos fueron preincubados con clorimipramina durante 2 minutos y posteriormente se coaplicaron AcCo y clorimipramina.

Los valores obtenidos ajustando la ecuación 2 fueron: la  $EC_{50}$  de la AcCo sola fue de  $39.89 \pm 2.14 \mu\text{M}$ , y el  $nH$  de  $1.40 \pm 0.25$ , en tanto que estos valores en presencia de clorimipramina fueron  $65.69 \pm 3.57 \mu\text{M}$  y  $1.76 \pm 0.16$ , respectivamente. Las curvas de la Figura 16 muestran que la inhibición inducida por la clorimipramina no fue superada por el incremento en la concentración de la AcCo y que el porcentaje de inhibición fue independiente de la concentración de la AcCo, por lo que se sugiere que la inhibición es de tipo no competitivo.

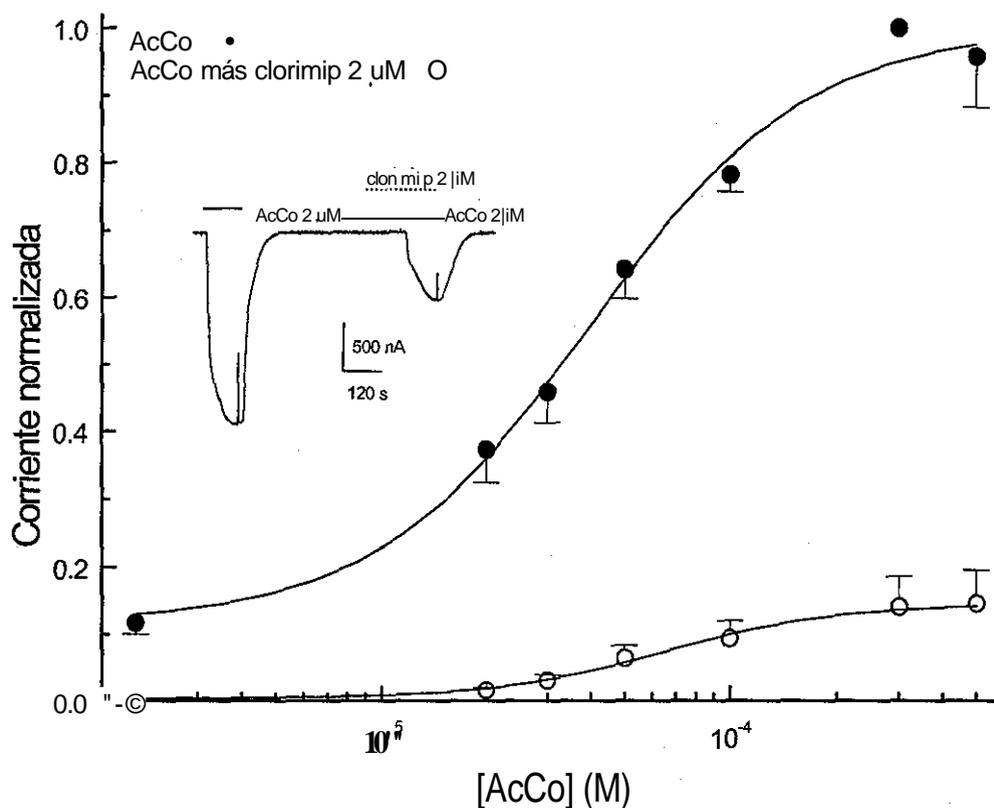


Figura 16. **Inhibición de la 1-AcCo por efecto de la clorimipramina.** Las gráficas muestran la relación concentración-respuesta para AcCo sola y en presencia de clorimip. Las amplitudes de las I-AcCo fueron normalizadas a la I-AcCo control máxima, y se ajustaron con la ecuación 2 (líneas continuas). **Inserto:** Registros representativos de la I-AcCo control y aquella en presencia de clorimip. Cada punto se obtuvo de tres ovocitos.

## El efecto del voltaje en la inhibición

La Figura 17 muestra un registro típico del efecto de 2  $\mu\text{M}$  de clórimipramina en la corriente de membrana inducida por 1  $\mu\text{M}$  AcCo. El potencial de membrana del ovocito se mantuvo a -60 mV, y a partir de éste se aplicaron pulsos de voltaje (desde -140 a 40 mV en incrementos de 20 mV), antes y durante la aplicación de AcCo sola y con clórimipramina.

La corriente obtenida en presencia de clórimipramina fue comparada con la respuesta control en cada potencial de membrana. Los resultados obtenidos fueron analizados usando un modelo de sólo un sitio de unión [Woodhull 1973; García-Colunga y Miledi, 1996]. El bloqueo de la corriente por efecto de la clórimipramina fue dependiente del voltaje. La distancia eléctrica calculada fue de  $0.14 \pm 0.06$  ( $n = 6$ ), lo que indica que la clorimipramina, al igual que la imipramina, posiblemente interactúa dentro del canal iónico en una región cercana a la porción extracelular del R-nic neuronal  $\alpha 2\text{P4}$ . La  $IC_{50}(0)$  fue de 1.60  $\mu\text{M}$ , un valor semejante al obtenido a -60 mV.

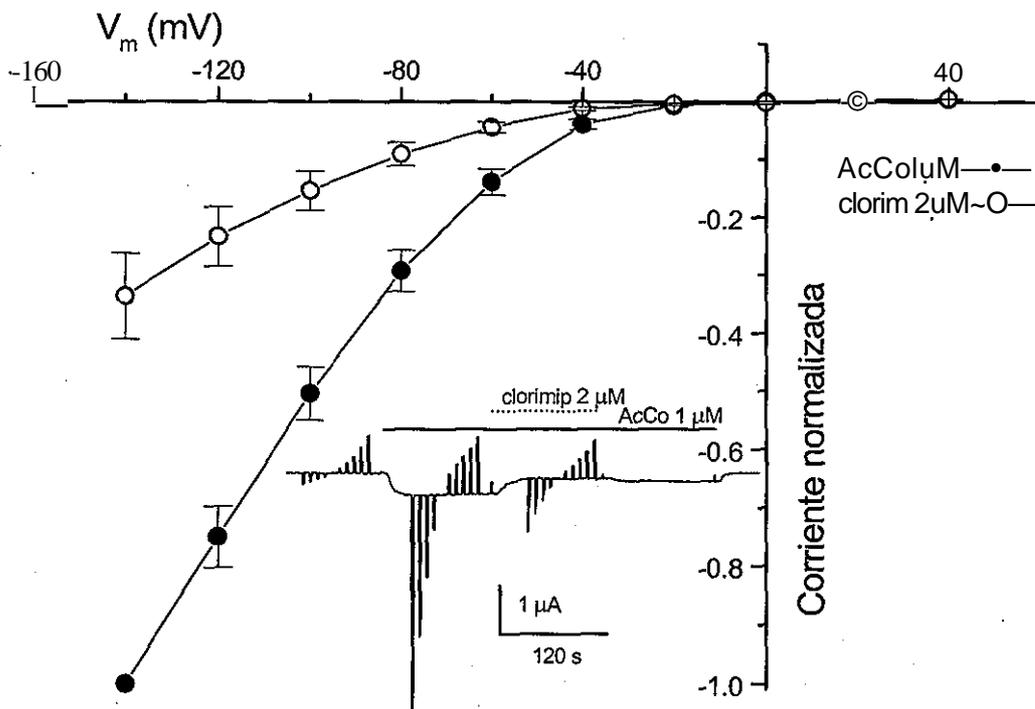


Figura 17. Dependencia al voltaje de la inhibición de la 1-AcCo por la clorimipramina. Las relaciones I-AcCo/voltaje en ausencia y presencia de clorimip. El potencial de membrana se mantuvo a -60 mV y se aplicaron pulsos de 20 mV desde -140 mV hasta 40 mV, cuando los ovocitos fueron perfundidos con solución de Rínger, Rínger más AcCo y Rínger más AcCo y clorimip. La magnitud de la respuesta fue normalizada a la I-AcCo control obtenida en -140 mV y después fueron graficadas contra el potencial de membrana. **Inserto:** Registro representativo de la respuesta inducida por AcCo sola y en presencia de clorimip. El número de ovocitos estudiados fue de 6.

### Efecto de la clorimipramina en el decaimiento de la corriente

Cuando las corrientes de membrana fueron inducidas con la aplicación 100  $\mu$ M AcCo durante varios minutos, éstas alcanzaron un pico de corriente y posteriormente declinaron. Cuando los ovocitos fueron expuestos a 100  $\mu$ M AcCo el pico de corriente fue de  $4.38 \pm 0.65$   $\mu$ A, y en presencia de 2  $\mu$ M o

10  $\mu\text{M}$  de clorimipramina, éste se redujo ostensiblemente a  $1.06 \pm 0.53$  ( $\mu\text{A}$  y  $0.86 \pm 0.20$   $\mu\text{xA}$ , respectivamente (Fig. 18A).

El decaimiento de la I-AcCo se analizó de igual manera como se explicó anteriormente para la imipramina. Primero: se comparó el porcentaje de la corriente que decae al final de la aplicación de la AcCo sola o con clorimipramina con respecto a su propio pico de corriente ( $D_{\bar{n}}$ ); este valor fue mayor en presencia de clorimipramina. Segundo: la tasa de decaimiento fue ajustada con funciones exponenciales (ecuación 5). El decaimiento de la corriente control se ajustó con una función exponencial, mientras que en presencia de clorimipramina (2 o 10  $\mu\text{M}$ ) el decaimiento declinó bifásicamente ajustándose a dos funciones exponenciales (Fig. 18). Sin embargo, con 10  $\mu\text{M}$  de clorimipramina se observó un componente adicional entre los componentes lento y rápido, el cual consistió en un incremento breve y pequeño de la corriente ( $\sim 30$  s) que no fue considerado en el ajuste de funciones exponenciales.

Las dos constantes de tiempo del decaimiento de la I-AcCo en presencia de clorimipramina fueron más rápidas que la del control (Tabla 11 y Fig. 18). La tasa de las amplitudes  $A_j/A_r$  disminuye con el aumento de la concentración de clorimipramina, en tanto que  $A_r$  permanece más alta que el  $A_j$ . Además, las constantes de tiempo no varían (Tabla 11 y Fig. 18).

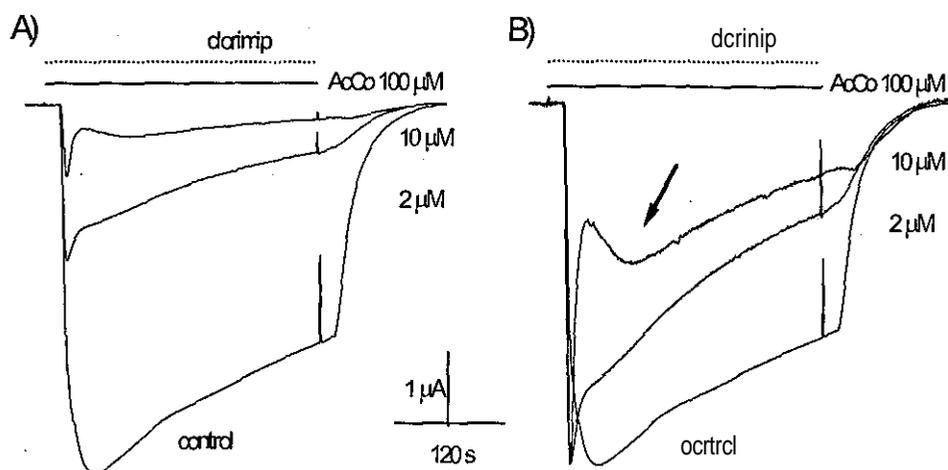


Figura 18. La clorímipramina acelera el decaimiento de la 1-AcCo. A) Registros representativos superpuestos de la 1-AcCo control y aquellos obtenidos en presencia de clorimip, a las concentraciones señaladas. B) Los mismos registros de (A) normalizados. La flecha ilustra el incremento transitorio de la f-AcCo en presencia de clorimip.

**Tabla 11. Amplitudes y constantes de tiempo de los componentes del decaimiento de la corriente.**

Parámetros	AcCo 100 $\mu$ M (8)	AcCo 100 $\mu$ M + 2 $\mu$ JVI clorimipramina (4)	AcCo 100 $\mu$ M + 10 $\mu$ JVI clorimipramina (4)
$D_{fit}$	$0.60 \pm 0.09$	$0.74 \pm 0.05$	$0.94 \pm 0.03$
$f_0$	$0.34 \pm 0.05$	$0.11 \pm 0.04$	$0.03 \pm 0.02$
$A_T$	$0.66 \pm 0.05$	$0.37 \pm 0.11$	$0.66 \pm 0.13$
Tr(s)	$219.68 \pm 13.57$	$3.71 \pm 0.48$	$4.09 \pm 0.55$
$A_i$	-----	$0.54 \pm 0.13$	$0.31 \pm 0.13$
Ti(s)	-----	$167.17 \pm 41.94$	$142.79 \pm 32.95$
Al/Ar	-----	1.46	0.46

Las amplitudes de los componentes rápido (A), lento (A) y del componente asintótico ( $f_0$ ) fueron normalizados a la amplitud de la corriente total. La aplicación de AcCo y clorimipramina fue simultánea. Los valores mostrados son los promedios y los EEM. Entre paréntesis se indica el número de ovocitos estudiados.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró que diversos compuestos con diferentes estructuras químicas y selectividad para los sistemas de recaptura de NA, 5-HT y DA son capaces de inhibir la respuesta inducida por AcCo en los R-nic de los subtipos muscular fetal (*Torpedo* y ratón) y en el neuronal  $\alpha 2p4$ . Los compuestos estudiados en este trabajo muestran un perfil de inhibición diferente en cada subtipo de receptor, pero se deberán realizar más estudios para conocer con mayor detalle su interacción, no sólo con estos subtipos de receptores, sino también con otros subtipos de R-nic neuronales y muscular adulto.

Esta exploración inicial proporcionó otro resultado que podría ser relevante para comprender mejor la interacción de la fluoxetina y norfluoxetina con los R-nic. En estudios previos se ha mostrado que la fluoxetina, un inhibidor selectivo del sistema de recaptura de 5-HT ampliamente utilizado en la práctica clínica [Sthal, 2000], produce una inhibición no competitiva en R-nic de los subtipos muscular fetal y los neuronales  $\alpha 2p4$ ,  $\alpha 3(34$  y  $\alpha 7$  expresados en ovocitos de *Xenopus* [García-Colunga *et al*, 1997a; Maggi *et al*, 1998], en los subtipos muscular fetal expresado en la línea celular TE671/RD y los neuronales  $\alpha 3p4ct5$  y  $\alpha 3)34a5p2$  expresados en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano [Fryer y Lukas, 1999a], e inhibe la liberación de NA mediada por R-nic en hipocampo de rata [Hennings *et al*, 1997].

En este trabajo se muestra que la norfluoxetina tiene una potencia de inhibición semejante a la fluoxetina en los R-nic musculares y neuronales  $\alpha_2$  (34). La norfluoxetina se produce *in vivo* como resultado de la desmetilación de la fluoxetina por el sistema enzimático P450 (CYP450) presente en el hígado e intestino delgado, y se ha demostrado que es un metabolito activo en los sistemas de recaptura de monoaminas [Stahl, 2000]. En estudios con pacientes deprimidos en donde se evaluaron las concentraciones plasmáticas de fluoxetina y norfluoxetina, se encontró que es de  $\sim 1.4 \mu\text{M}$  y en cerebro alcanzan 20-80  $\mu\text{M}$  [Karson *et al.*, 1993; Kornhuber *et al.*, 1995], por lo que resulta probable que tanto la fluoxetina como la norfluoxetina puedan inhibir diferentes subtipos de R-nic en el SNC.

El efecto inhibitorio no competitivo de la imipramina en los R-nic musculares (*Torpedo* y muscular fetal) observados en este trabajo, concuerdan con los reportados por Aronstam [1981] y de Eldefrawi y colaboradores [1981], realizados con R-nic de *Torpedo* y músculo de rana. En estos receptores el sitio de unión de la imipramina no está bien establecido. Por un lado, Aronstam [1981] propuso que el sitio de unión de la imipramina era el mismo que el de la fenciclidina y la perhidrohistriónicotina, que se encuentra dentro del canal iónico; por otro lado, Eldefrawi y colaboradores [1981] propusieron que el sitio de unión se localiza dentro del canal iónico, pero que es diferente al de los compuestos antes mencionados.

En contraste con el efecto de la imipramina en el músculo de rana, donde se ha reportado que la imipramina no modifica el decaimiento de la corriente de la placa terminal [Eldefrawi *et al.*, 1981], en este trabajo se encontró que la imipramina acelera el decaimiento de la corriente en los R-nic musculares, lo

que podría deberse a las diferencias en las preparaciones experimentales, y de la composición de los receptores (difieren en una subunidad), en particular a las diferencias moleculares en la región M2 que existen entre el R-nic de rana adulta y ratón fetal [Le Novère y Changeux, 2001].

Tanto la clorimipramina como la imipramina aceleraron el decaimiento de la corriente en los R-nic estudiados aquí, fenómeno que se debe al bloqueo de los canales iónicos y probablemente al aumento en la desensibilización. Sin embargo, se requieren estudios más detallados para evaluar los cambios en la cinética de los R-nic.

Por otra parte, García-Cohmga y Miledí [1996] obtuvieron un valor de 0.17 de distancia eléctrica para el sitio de unión de la espiperona (antagonista de receptores de 5-HT) y, en este trabajo, se calculó una distancia similar para la imipramina (0.12) en el mismo subtipo de receptor, por lo que es probable que ambos compuestos interactúen en el mismo sitio o en sitios muy cercanos dentro del canal iónico del R-nic.

Se ha reportado que la imipramina (1  $\mu$ M) potencia la corriente inducida por AcCo en fibras musculares de rana [Eldeñrawi *et al*, 1981]. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales de este trabajo, concentraciones semejantes e incluso menores ejercen un efecto inhibitorio, pero se necesita realizar más estudios para esclarecer si ocurre una potenciación en este subtipo de R-nic.

En los dos subtipos de R-nic musculares fetales estudiados aquí, el de *Torpedo* y el muscular, la  $IC_{50}$  de la imipramina en el *Torpedo* fue menor que aquella encontrada en el muscular; es probable que esto se deba a las diferencias moleculares existentes en el segmento M2, el cual forma el canal iónico [Le Novère y Changeux, 2001]. Se sabe que pequeñas diferencias en

los AA en el interior del canal pueden provocar diferencias funcionales. Por ejemplo, Eterovic y colaboradores [1993] encontraron que la diferencia en la afinidad a la fenciclidina entre R-nic del órgano eléctrico del *Torpedo* y el muscular fetal de ratón, se debía a la diferencia de tres AA localizados dentro del canal iónico.

Por otra parte, el efecto inhibitorio de la imipramina en los R-nic neuronales  $\alpha_2$ , al igual que en los musculares, al parecer se realiza a través de un mecanismo estérico. Considerando la distancia eléctrica obtenida (0.10), parece probable que el sitio de unión de la imipramina se localice dentro del canal iónico, cerca de la parte extracelular.

El efecto inhibitorio en el R-nic neuronal  $\alpha_2$  mostrado por la espiperona, la fluoxetina [García-Colunga y Miledi, 1995; García-Colunga *et al*, 1997a], la imipramina y clorimipramina estudiados en este trabajo, parecen ejercer su efecto inhibitorio a través de un mecanismo estérico. También es probable que el sitio de unión de la clorimipramina, imipramina y espiperona sea el mismo, o estén muy cercanos, localizados todos más hacia la región extracelular que el de la fluoxetina, ya que los valores de distancias eléctricas son semejantes (espiperona = 0.17, imipramina = 0.10, clorimipramina = 0.14, fluoxetina = 0.23).

El efecto inhibitorio mostrado por los compuestos estudiados en este trabajo sobre los R-nic, también lo presentan otros antidepresivos en diferentes subtipos de R-nic neuronales. Los antidepresivos amitriptilina y nortriptilina presentan este efecto en R-nic de la unión neuromuscular de rana [Schofield *et al*, 1981], el bupropión, la sertalina, la paroxetina, la nefazadona y la venlafaxina muestran inhibición no competitiva en R-nic de los subtipos

muscular en la línea celular TE671/RD y en los neuronales  $\alpha_3\beta_4\gamma_5$  y  $\alpha_3\beta_4\gamma_5\delta_2$  presentes en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano [Fryer y Lukas, 1999a; 1999b]. Además, la nisoxetina, citalopram, nomifensina y desimipramina muestran un efecto similar en los R-nic que median la liberación de NA en hipocampo y en neuronas del ganglio cervical superior de rata [Hennings *et al*, 1999].

El mecanismo estérico de la imipramina y la clorimipramina en los R-nic neuronales  $\alpha_2(34)$ , propuesto en este estudio, contrasta con el mecanismo de inhibición alostérico propuesto para la imipramina por Rana y colaboradores [1993] en R-nic del neuroblastoma humano SH-SY5Y, los cuales están compuestos por subunidades  $\alpha_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\gamma_5$ ,  $\delta_2$  y  $\epsilon$  [Lukas, 1998], lo cual sugiere que el mecanismo de acción varía entre los diferentes subtipos de R-nic neuronales. Sin embargo, el mecanismo de inhibición estérico, al parecer, es el más común, ya que en los compuestos en los que se ha estudiado en detalle el mecanismo de inhibición, éste se presenta en la mayoría de los casos. El mecanismo estérico se ha encontrado en la interacción de la fluoxetina con los R-nic musculares fetal y los neuronales  $\alpha_2\beta_3$ ,  $\alpha_3\beta_4$  y  $\alpha_1$  [García-Colunga *et al*, 1997a; Maggi *et al*, 1998], la amitriptilina y la nortriptilina en los R-nic de la unión neuromuscular de rana [Schofield *et al*, 1981], la imipramina y la clorimipramina en R-nic de *Torpedo* [Aronstam y Narayan, 1981; Aronstam, 1981; Eldefrawi *et al*, 1981].

Aunque se requieren más estudios para conocer las implicaciones clínicas de las interacciones entre los compuestos inhibidores de los sistemas de recaptura y los diferentes R-nic, las evidencias experimentales anteriormente analizadas sugieren que el antagonismo de estos compuestos en los R-nic no

es un fenómeno aislado, sino por el contrario, una característica común. Es probable, además, que la interacción entre los R-nic y los antidepresivos ocurra *in vivo*, si consideramos que las  $IC_{50}$  de la clorimipramina (1.53  $\mu$ M) y de la imipramina (3.65  $\mu$ M) encontradas en este estudio son inferiores a las concentraciones encontradas en el cerebro de pacientes tratados con estos fármacos. Por ejemplo, las concentraciones encontradas en la sangre de pacientes con trastornos de ansiedad son de  $\sim 0.3$   $\mu$ M [Marcourakis *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2000], pero en el cerebro alcanzan concentraciones 13 veces mayores [Weigmann *et al.*, 2000]. En lo que respecta a la imipramina, las concentraciones plasmáticas en pacientes deprimidos pueden alcanzar  $\sim 2$   $\mu$ M [Hollister, 1982], y se ha sugerido que las concentraciones en el cerebro pueden ser 11-16 veces mayores [Besret *et al.*, 1996].

Se ha mostrado que tanto la clorimipramina como la imipramina producen metabolitos bioactivos *in vivo*, principalmente sus productos desmetilados, la desimipramina y la desmetilclorimipramina, cuyas concentraciones en cerebro son semejantes a las de sus precursores [Besret *et al.*, 1996; Weigmann *et al.*, 2000]. Además, se ha mostrado que la desimipramina, tiene efectos similares a los de la imipramina en los R-nic presentes en la línea celular SH-SY5Y [Rana *et al.*, 1993], en tanto la desmetilclorimipramina es más potente en R-nic de *Torpedo* [Aronstam y Narayanan, 1981], por lo que es razonable suponer que estos metabolitos bioactivos también interactúen con los R-nic *in vivo*.

Por otra parte, es importante resaltar que los tratamientos con antidepresivos son crónicos y llegan a durar meses [Stalh, 2000], por lo que resulta necesario estudiar los efectos crónicos de los antidepresivos sobre los

diferentes subtipos de R-nic, ya que, como se mostró en la Figura 12, la imipramina puede interactuar con el R-nic neuronal  $\alpha_2(34)$  incluso en estado de reposo y provocar una disminución de la respuesta al agonista.

Otro aspecto que debería explorarse es el efecto de inhibición de los R-nic por la clorimipramina durante la terapia para dejar de fumar, ya que los antidepresivos bupropión, la fluoxetina, nortriptilina y el bloqueador no competitivo de R-nic, la mecamilamina, son efectivos en estas terapias [Leischow y Cook, 1999]. El mecanismo de acción no se conoce bien, pero se propone que estos compuestos participan modulando los niveles de NA y DA [Leischow y Cook, 1999]. Considerando que la clorimipramina muestra propiedades inhibitorias similares en el sistema de recaptura de monoaminas y en la inhibición de R-nic [Richelson, 1994; Schofield *et al.*, 1981; Fryer y Lukas, 1999b; García-Colunga *et al.*, 1997a; Maggi *et al.*, 1998], es razonable pensar que quizás la clorimipramina sea de utilidad en la terapia para dejar de fumar; sin embargo, esto requiere de una investigación detallada.

Por último, sería de utilidad conocer el efecto de los compuestos estudiados aquí sobre R-nic neuronales  $\alpha_4(32)$  y  $\alpha_7$ , debido al hecho de que tales receptores son los más abundantes y se encuentran expresados en estructuras relacionadas con los estados de emoción [Picciotto *et al.*, 2000].

## CONCLUSIONES

1. Los inhibidores de los sistemas de recaptura de monoaminas, la imipramina, 6-nitro-quipazina, trazodona, clorimipramina, indatralina, fluoxetina, norfluoxetina y zimelidina, inhiben la respuesta a AcCo en los R-nic de *Torpedo*, musculares del subtipo fetal y neuronales  $\alpha 2\beta 4$ .
2. Los compuestos menos potentes (< 50%) en los tres subtipos de R-nic fueron: trazodona, 6-nitro-quipazina y zimelidina. Los compuestos más potentes fueron: indatralina, clorimipramina, imipramina, fluoxetina y norfluoxetina.
3. El perfil farmacológico de estos compuestos en cada subtipo de R-nic fue:  
NEURONALES  $\alpha 2\beta 4$ : norfluoxetina > clorimipramina > indatralina > fluoxetina > imipramina > zimelidina > 6-nitro-quipazina > trazodona;  
MUSCULARES DEL SUBTIPO FETAL DE RATÓN: norfluoxetina > fluoxetina > imipramina > clorimipramina > indatralina > zimelidina > trazodona > 6-nitro-quipazina; *TORPEDO*: imipramina > fluoxetina > clorimipramina > indatralina > zimelidina > 6-nitro-quipazina > trazodona.
4. La imipramina inhibe la respuesta a AcCo en los R-nic musculares del subtipo fetal, neuronales  $\alpha 2\beta 4$  y de *Torpedo* en forma concentración dependiente. En los R-nic musculares del subtipo fetal y neuronales  $\alpha 2\beta 4$  la imipramina presenta un antagonismo no competitivo a través de un mecanismo estérico.

5. La imipramina interactúa con los R-nic musculares fetales y neuronales  $\alpha_2\beta_4$  en la conformación de reposo.
6. La clorimipramina inhibe la respuesta a AcCo en los R-nic neuronales  $\alpha_2\beta_4$  de forma concentración dependiente y no competitivo, a través de un mecanismo estérico.
7. Al parecer, la clorimipramina no interactúa con los R-nic neuronales  $\alpha_2\beta_4$  en la conformación de reposo.
8. La imipramina y la clorimipramina interactúan con los R-nic neuronales  $\alpha_2\beta_4$  en un mismo sitio dentro del canal, o en sitios muy cercanos.

## ANEXO A

### **Extracción del ARNm del órgano eléctrico de *Torpedo californica*^ mediante el método de tiocianato de guanidina.**

Este método se usa para aislar ARN total a partir de muestras de tejidos.

#### *Materiales*

1. Dietilpirocarbonato (DPC).
2. Agua desionizada estéril.
3. Citrato de sodio.
4. Sarcosil.
5. Tiocianato de guanidina.
6. Fenol.
7. Cloroformo.
8. Alcohol isoamílico.
9. Acetato de sodio.
10. Ácido acético.
11. Mercaptoetanol.
12. Isopropanol.
13. Isoproterenol.

## *Soluciones*

Todas las soluciones se elaboran con agua desionizada, estéril y tratada con dietilpirocarbonato (DPC).

1. Agua tratada con DPC.
  - A un litro de agua desionizada estéril se le agrega 1 ml de DPC.
  - Agitar durante dos horas.
  - Dejar reposar toda la noche.
  - Esterilizar,
2. Citrato de sodio al 0.75 M con pH de 7.4.
3. Sarcosilal 10%.
4. Solución D.
  - 200 ml de agua DPC estéril.
  - 189.05 g de tiocianato de guanidina.
  - 13.33 ml de la solución de citrato de sodio al 0.75 M.
  - 20 ml de la solución de sarcosyl al 10%.
  - Mezclar hasta que todo se disuelva y aforar a 400 ml. Se debe proteger de la luz y conservar a 4 °C.
5. Fenol saturado con agua.
  - Al fenol (ya descongelado) agregarle un volumen igual de agua estéril (sin DPC) y agitar durante 20 minutos.
  - Dejar reposar hasta que las fases se separen.
  - Eliminar la fase superior. Repetir una vez, teniendo la precaución de dejar un poco de la fase superior. La fase inferior es la que se usa.
6. Cloroformo: alcohol isoamílico.
  - Poner 49 partes de cloroformo y una parte de alcohol isoamílico, mezclar.

7. Acetato de sodio 2M a pH 4.
  - A 30 ml de ácido acético agregar 16.4 g de acetato de sodio, ajustar a un volumen final de 100 ml y pH de 4.
8. Solución D más mercaptoetanol.
  - A 20 ml de solución D agregar 144  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol, agitar.

### *Procedimiento*

1. En un tubo Falcon de 50 ml poner 1 g de tejido sólido y agregar 10 ml de solución D más 2-mercaptoetanol; homogenizar durante 2-3 minutos.
2. Adicionar al tubo 1 500  $\mu$ l de la solución de acetato de sodio al 2 M, pH 4, homogenizar e invertir el tubo tres veces.
3. Adicionar 1 volumen equivalente de fenol saturado con agua (10 ml), homogenizar por inversión del tubo, suavemente.
4. Adicionar 3 000  $\mu$ l de la solución cloroformo-alcohol isoamílico, agitar enérgicamente durante 10 segundos y poner el tubo en hielo durante 15 minutos.
5. Centrifugar durante 20 minutos a 10 000 rpm, a temperatura ambiente.
6. Sin perturbar la interfase, transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo, al cual se le agrega un volumen equivalente de isopropanol y se coloca a -20 °C durante 1 hora. El tubo con el precipitado se desecha.
7. Centrifugar a 10 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C.
8. Decantar el sobrenadante (sin permitir que se seque el precipitado).
9. Resuspender en 8 ml de solución D y poner la suspensión en un baño con agua a 65 °C hasta que se disuelva el material. Ajustar con un volumen equivalente de isoproterenol.

10. Dejar precipitar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por lo menos durante 1 hora con 30 minutos, pero preferentemente toda la noche.
11. Centrifugar a 10 000 rpm durante 30 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Decantar el sobrenadante y adicionar 10 ml de etanol al 70%.
12. Centrifugar a 10 000 rpm durante 30 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Decantar el sobrenadante y adicionar 10 ml de etanol al 70%.
13. Decantar el sobrenadante y adicionar 7.5 ml de etanol al 70%.
14. Centrifugar a 10 000 rpm durante 30 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Decantar el sobrenadante. Poner el tubo en posición invertida y dejar secar al aire.
15. Resuspender en agua libre de ARN y ARNasas (generalmente  $300\text{ }\mu\text{l}$ ).

### **Purificación del ARNm por cromatografía en oligo (dt)" celulosa.**

#### *Materiales*

1. Columnas de oligo (dt)" celulosa.
2. Agua estéril.
3. DPC.
4. NaOH.
5. KCl.
6. HEPES.
7. NaOH.

#### *Soluciones*

1. NaOH.
2. KCl al  $0.5\text{ }\times$  HEPES al 5 mM y pH 7.5 ajustado con NaOH.

3. KCl 1 M.
4. HEPES 5 mM con pH 7.5 ajustado con NaOH.
5. Etanol al 70% preparado con agua y con DPC.

### *Procedimiento*

1. Preparación de las columnas.
2. La noche anterior a la purificación, a las columnas se les pone agua estéril con 0.1% de DPC, y se dejan agitando durante toda la noche.
3. Al día siguiente, las columnas se esterilizan en la autoclave.
4. Pasar 8 ml de solución de NaOH al 0.1 N y se deja drenar completamente.
5. Lavar con 8 ml de agua estéril.
6. Lavar con 8 ml de solución de KCl al 0.5 M y HEPES al 5 mM y pH de 7.5, ajustado con NaOH.
7. Adicionar a la muestra un volumen equivalente (300  $\mu$ l) de solución de KCl a 1M, mezclar y calentarla a 65 °C durante 5 minutos.
8. Aplicar la muestra a la columna, dejar drenar y coleccionar en un tubo asentado en hielo. Reaplicar la muestra 3 veces más.
9. Una vez que acabe de pasar por cuarta vez la muestra por la columna, agregar a esta 4 ml de solución de KCl al 0.5 M y HEPES al 5 mM y pH de 7.5, ajustado con NaOH.
10. Cuando pase toda la solución, cambiar el tubo de recolección por uno nuevo.
11. Para eluir el ARNm se agregan 3 ml de solución (a 37 °C) de 5 mM de HEPES a pH 7.5, ajustada con NaOH.
12. Agregar 150  $\mu$ l de solución de NaCl a 4 M.
13. Agregar etanol absoluto y mezclar. Precipitar toda la noche a -20 °C.

14. Centrifugar a 10 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Decantar el sobrenadante.
15. Adicionar 8 ml de solución de etanol al 70% (preparada con agua con DPC) y centrifugar a 10 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Decantar el sobrenadante.
16. Adicionar 5 ml de solución de etanol al 70% y centrifugar a 10 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Decantar el sobrenadante.
17. Lavar con 500  $\mu$ l de etanol al 70% para resuspender y transferir el contenido a un microtubo. Volver a lavar el tubo de 15 ml dos veces más con 500  $\mu$ l de etanol al 70%. El volumen final en el microtubo es de 1 500  $\mu$ l.
18. Centrifugar a 10 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Decantar el sobrenadante y poner el tubo en posición invertida.
19. Poner la muestra durante 5 minutos en un desecador con vacío.
20. Resuspender en 10  $\mu$ l de agua libre de ARN y ARNasa calentada a 65 °C.
21. Calentar la muestra a 65 °C durante 5 minutos.
22. Etiquetar.
23. Cuantificar el contenido de ARNm.

### **Producción del cARNm**

La estrategia general utilizada para la producción de los ARNm complementarios (cARNm) que codifican para las subunidades de los R-nic neuronales ( $\alpha 2(34)$ ) y los musculares ( $\alpha 1(31y5)$ ) consistió, en primer lugar, en la clonación de los ADN complementarios (cADN) respectivos. El gen de

resistencia a ampicilina y uno de los cADNs están incorporados en vector de clonación plasmídicos (ver Tabla A), los cuales fueron introducidos en bacterias *E. coli* competentes. Posteriormente, las bacterias transformadas fueron cultivadas en medios nutritivos con ampicilina durante 16 horas. Después, se extrajo y se purificó el ADN del plásmido, el cual contiene millones de copias del fragmento de cADN original.

Para poder realizar la transcripción *in vitro*, antes fue necesario linearizar el ADN del plásmido mediante enzimas de restricción, conservando intacta la secuencia del promotor a la cual se une la ARN polimerasa II. Después se realizó la transcripción *in vitro* y finalmente se purificó el cARNm.

En la Tabla A se muestran las enzimas de restricción y las ARN polimerasas usadas en las transcripción *in vitro* de los diferentes cADNs que codifican para las diferentes subunidades de los R-nic neuronales  $\alpha 2(34)$  y musculares.

En las siguientes secciones se describen las metodologías utilizadas para la amplificación del cADN, su extracción y linearización, así como la transcripción *in vitro* y su posterior purificación.

## **Transformación de bacteria competentes y cultivo de bacterias transformadas.**

### *Materiales*

1. Alícuotas de bacterias competentes.
2. Plásmidos con el cADN incorporado.
3. Medio LB (Luria Bertani) sin ampicilina.
4. Baño a 42 °C.

5. Agitador de bacterias a 37 °C.
6. Cajas de Petri preparadas con medio de cultivo LB con ampicilina (40 ng de LB/ml de ampicilina).
7. Hielo.

### *Procedimiento*

1. Descongelar (mantener en hielo) una alícuota de bacterias competentes, después agregar 5  $\mu$ l de ADN y agitar manualmente.
2. Incubar en hielo durante 30 minutos.
3. Colocar la alícuota con el ADN en el baño de agua a 42 °C durante 50 segundos y después ponerla en hielo durante 2 minutos.
4. Agregar 200  $\mu$ l de LB sin ampicilina y agitar durante 45 minutos.
5. Tomar 50  $\mu$ l de la alícuota y ponerlos en una caja de Petri con medio LB/ampicilina y espatular.
6. Dejar secar la caja durante 30 minutos.
7. Incubar la caja a 37 °C durante 16 horas (toda la noche) en agitación a 225 rpm.

### **Obtención del ADN del plásmido**

#### *Materiales*

1. Solución I.
  - Tris 25 mM, pH = 8.
  - Glucosa 50 mM.
  - EDTA 10mM, pH = 8.
  - Aforar a 200 ml, esterilizar por filtración.

2. Solución II.
  - NaOH 0.2 M.
  - SDS 1%.
  - Aforar a 100 ml con agua.
3. Solución III.
  - Acetato de potasio 3 M.
  - Ácido acético 5 M.
  - Aforar a 100 ml con agua.
4. Solución PEG.
  - NaCl 1.6 M.
  - PEG 8000 al 13%.
  - Aforar a 100 ml con agua.
5. Etanol 70%.
6. Agua estéril.

### *Procedimiento*

1. Elegir una de las colonias de la placa de agar y sembrarla en 100 ml de medio LB líquido con ampicilina (60  $\mu$ g/ml de medio). Cultivar en un matraz Erlenmeyer a 37 °C y agitar durante 6 horas a 225 rpm.
2. Transferir el cultivo a dos tubos (Falcon) de 50 ml estériles y centrifugar a 6 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos.
3. Decantar y resuspender el precipitado en 7.5 ml de solución I.
4. Ajustar a 15 ml de solución II. Mezclar por inversión 10 veces. Dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Agregar 7.5 ml de solución III, mezclar por inversión 10 veces. Dejar en hielo durante 5 minutos.

6. Centrifugar a 6 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos.
7. Resuspender el sobrenadante con un volumen igual de isopropanol, conservar a -20 °C durante 30 minutos.
8. Centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos.
9. Lavar la pastilla con 5 ml de etanol al 70%.
10. Centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
11. Agregar 3 ml de etanol al 70% y transferir a 2 microtubos de 1.5 ml.
12. Centrifugar a 14 000 rpm a 20 °C durante 10 minutos, y dejar secar al aire durante 10 minutos.
13. Disolver la pastilla con 500  $\mu$ l de agua estéril y centrifugar a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
14. Colectar el sobrenadante y agregarle 10  $\mu$ l de ARNasa (a -20 °C),
15. Incubar a 37 °C durante 1 hora 30 minutos.
16. Agregar un volumen igual de solución de PEG. Mezclar brevemente.
17. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
18. Centrifugar a 14 000 rpm a 20 °C durante 10 minutos.
19. Lavar la pastilla 2 veces con etanol al 70%. Dejar secar.
20. Resuspender la pastilla en 300  $\mu$ l de agua estéril.
21. Cuantificar el ADN por espectrofotometría.
22. Conservar el ADN circular obtenido a -20 °C.

## **Linearización del ADN con enzimas de restricción**

### *Materiales*

1. ADN.
2. Enzima de restricción.
3. Amortiguador.
4. Agua estéril.

### *Procedimiento*

1. Por cada  $\mu\text{g}$  de ADN se agregan 2 U de la enzima respectiva (ver Tabla A). Se agrega el amortiguador de la enzima (viene a 10X) y se añade el agua estéril necesaria para que la enzima quede a una concentración de IX.
2. Se mezcla todo y se centrifuga brevemente.

## **Purificación del ADN linearizado**

### *Materiales*

1. Reacción de linearización.
2. Amortiguador TE, pH 8 en agua con DPC.
3. Cloroformo.
4. Fenol saturado (con amortiguador TE a pH 8 en agua con DPC).
5. Acetato de sodio.
6. Etanol al 100%.
7. Etanol al 70%.
8. Alcohol isoamílico.

### *Procedimiento*

1. A la mezcla de la reacción de linearización de ADN agregar 100  $\mu$ l de amortiguador TE a pH 8 en agua con DPC y mezclar.
2. Agregar un volumen igual de fenol saturado (con amortiguador TE a pH 8 en agua con DPC), mezclando suavemente durante 20 segundos.
3. Centrifugar a 10 000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos.
4. Transferir la fase superior a otro tubo y agregarle un volumen igual de la solución cloroformo-alcohol isoamílico (24 partes de cloroformo por 1 parte de alcohol isoamílico). Mezclar suavemente durante 20 segundos.
5. Transferir la fase superior en otro tubo y resuspenderlo en un 1/10 del volumen con acetato de sodio 3M a pH 6 y 2.5 volúmenes de etanol al 100%; enfriarlo en hielo.
6. Incubar a -70 °C durante 15 minutos.
7. Centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos.
8. Decantar el sobrenadante.
9. A la pastilla agregar etanol al 70% y centrifugar a 10 000 rpm a 4°C durante 15 minutos.
10. Decantar el sobrenadante.
11. Secar la pastilla en vacío durante 4 minutos.
12. Resuspender en agua estéril con DPC.
13. Conservar el ADN linearizado a -20 °C.

## Transcripción *in vitro*

### Material es

La mezcla de la reacción es la siguiente:

- Amortiguador de transcripción 5X.....5 pl
- DTT a 100 mM.....5  $\mu$ l
- Mezcla de nucleótidos\*.....9  $\mu$ l
- Capping a 2.5 mM.....12  $\mu$ l
- ADN linearizado.....10  $\mu$ g
- RNasin .....1.5  $\mu$ l
- Polimerasa (SP6 o T3).....40 unidades
- Agua (la necesaria para ajustar un volumen final de 50  $\mu$ l)
- Mezcla de nucleótidos:     2  $\mu$ l ATP  
  2  $\mu$ l CTP  
  2  $\mu$ l TTP  
  1.5  $\mu$ l GTP

### Procedimiento

1. Atemperar los reactivos durante 5 minutos, menos la enzima que se mantiene en hielo.
2. Adicionar los reactivos en un microtubo, dar un pulso en la centrífuga e incubar a 37 °C durante 2 horas.
3. Volver a agregar la misma cantidad de enzima e incubar durante 2 horas.
4. Agregar una U de enzima por cada  $\mu$ g de ADN en la reacción e incubar durante 15 minutos más.

## **Purificación del transcrito por fenol cloroformo**

### *Materiales*

1. Mezcla de reacción del transcrito de ARN (50  $\mu$ l).
2. Agua con DPC.
3. Fenol saturado con amortiguador TE (pH 4.5 en agua DPC).
4. Cloroformo.
5. Alcohol isoamílico.
6. Etanolal 100%.
7. Etanolal 70%.

### *Procedimiento*

1. A la mezcla de reacción del transcrito de ARN (50  $\mu$ l) agregar 100  $\mu$ l de agua con DPC.
2. Agregar 75  $\mu$ l de fenol saturado con amortiguador TE (pH 4.5 en agua DPC) y 75  $\mu$ l de la mezcla (24 partes de cloroformo por una parte de alcohol isoamílico) mezclar ~ 20 veces.
3. Centrifugar a 10 000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos.
4. Transferir la fase superior a otro tubo y agregar 150  $\mu$ l de la solución cloroformo-alcohol isoamílico; agitar durante 20 segundos.
5. Centrifugar a 10 000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos.
6. Transferir la fase superior a otro tubo y agregar 150  $\mu$ l de la solución cloroformo-alcohol isoamílico; agitar durante 20 segundos.
7. Centrifugar a 10 000 rpm a temperatura ambiente durante 3 minutos.

8. Resuspender la fase superior en 0.5 de su volumen en acetato de amonio (0.5 M) y 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío (mantenido en hielo).
9. Incubar a -70 °C durante 30 minutos.
10. Centrifugar a 12 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos.
11. Lavar con etanol al 70% una vez y centrifugar a 12 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos.
12. Secar en vacío.
13. Resuspender en 5  $\mu$ l de agua con DPC con una temperatura de 65 °C.
14. Cuantificar el transcrito.

Tabla A

Subunidad	Plásmido	Enzima de restricción	Promotor
a1	PSP65	SmaI	SP6
<b>pi</b>	PSP65	Hind III	SP6
<b>y</b>	PSP64	EcoRI	SP6
8	PSP65	SmaI	SP6
a2	PSP65	Hind III	SP6
p4	PBSK(-)	XhoI	T3

## BIBLIOGRAFÍA

- AIDLEY, D. J. (1998). Fast synaptic transmission, pp 108-128. En: The physiology of excitable cells, 4<sup>a</sup> Ed. Cambridge University Press.
- AKASU, T. y Koketsu, K. (1986). 5-Hydroxytryptamine decreases the sensitivity of nicotinic acetylcholine receptor in bull-frog sympathetic ganglion cells. *J. Physiol.* **380**: 93-109.
- ALKONDON, M. y Albuquerque, E. X. (1993). Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. Part I: Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**: 1455-1473.
- ALKONDON, M., Albuquerque, E. X. y Maelicke, A. (1999). Functional diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian central nervous system: physiological relevance, pp 161-186. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlín.
- ARIAS, H. R. (1998). Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem. Biophys. Acta* **1376**: 173-220.
- ARONSTAM, R. S. (1981). Interactions of tricyclic antidepressants with a synaptic ion channel. *Life Sci.* **28**: 59-64.

- ARONSTAM, R. S. y Narayanan, L. (1981). 3-chlorodibenzazepine binding to cholinergic receptors and ion channels. *Res. Comm. Chem. Pathol Pharmacol* 34: 551-554.
- BARRANTES, J. F. (1996). Canales activados por ligandos, pp 337-351. En: Biofísica y fisiología celular. Latorre, R., López Barneo, J., Bezanilla, F. y Llinás, R. (Eds). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- BESRET, L., Debruynee, D., Rioux, P., Bonvalot, T., Moulin, M., Zarifian, E. y Barón, J. C. (1996). A comprehensive investigation of plasma and brain regional pharmacokinetics of imipramine and its metabolites during and after chronic administration in the rat. / *Pharmac. Sci.* 85: 291-295.
- Buisson, B., Picard, F. y Bertrand, D. (2000). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: from biophysical properties to human diseases, pp 271-292. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlín.
- CLARKE, P. S. S. (1999). Functional anatomy of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian brain, pp 127-139. En: Neuronal nicotinic receptors. Arneric, S. P. y Brianni, J. D. (Eds). Wiles-Liss, New York, USA.
- CLEMENTI, F., Fornasari, D. Y Gotti, C. (2000). Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 393: 3-10.
- COLOMO, F., Rahamimoff, R. y Stefani, E. (1968). An action of 5-hydroxytryptamine on the frog motor end-plate. *Eur. J. Pharmacol.* 3: 272-274.
- CORRINGER, P. J., Le Novére, N. y Changeux, J. P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 431-458.

- CUSACK, B., Nelson, A. and Richelson, E. (1994). Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. *Psychopharmacol.* 114: 559-565.
- CHANGEUX, J. P. (1994). Química de las comunicaciones cerebrales. *Investigación y Ciencia.* Enero: 18-26.
- CHANGEUX, J. P., Bertrán, D., Corringer, J. P., Dehaene, S., Edelstein, S., Lena, C, Le Novère, N., Marubio, L., Picciotto, M y Zoli, M. (1998). Brain nicotinic receptors: Structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res. Rev.* 26: 198-216.
- CHANGEUX, J. P., Edelstein, S. J. (2001). Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Op Neurobiol.* 11: 369-377.
- DILGER, J. P. y Luí, Y. (1992). Desensitization of acetylcholine receptors in BC3-H1 cell. *Pflugers Arch.* 420: 479-485.
- DUMAN, R. S., Heninger, G. R. y Nestler, E. J. (1997). A molecular and celular theory of depression. *Are. Gen. Psychiatry* 54: 597-606.
- DUMAN, R. S., Malberg, J., Nakagawa, S. y D'Sa, C. (2000). Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol. Psychiatry* 48: 732-739.
- ELDEFRAWI, M. E., Warnick, J. E., Schofield, G. G., Albuquerque, E. X. y Eldefrawi, A. T. (1981). Interaction of imipramine with the ionic channel of the acetylcholine receptor of motor endplate and electric organ. *Biochem. Pharmacol* 30: 1391-1394.
- ETEROVIC, V. A., Li, L., Ferchmin, P. A., Lee, Y. H., Hann, R. M. Rodríguez, A. D. y McNamee, M. G. (1993). The ion channel of muscle and electric organ acetylcholine receptors: differing affinities for noncompetitive inhibitors. *Cell Mol Neurobiol.* 13: 111-121.

- FRANCIS, M. M. y Papke, R. L. (2000). The functional diversity of nicotinic receptors in the nervous system: perspectives on receptor subtypes and receptor specialization, pp. 301-336. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/Berlín.
- FRYER, J. D. y Lukas, R. J. (1999a). Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J. Neurochem.* 72: 1117-1124.
- FRYER, J. D. y Lukas, R. J. (1999b). Noncompetitive functional inhibition at diverse, human nicotinic acetylcholine receptor subtypes by bupropion, phencyclidine, and ibogaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288: 88-92.
- FUENTE, J. R. de la (1998). Psicofarmacología, pp 475-487. En: Biología de la mente. Fuente, J. R. de la y Álvarez-Leefmans, F. J. (Eds) El Colegio Nacional y el Fondo de Cultura Económica. Distrito Federal, México.
- GARATTINI, S., Barbui, C. Y Saraceno, B. (1998). Antidepressants agents: from tricyclics to serotonin uptake inhibitors. *Psychol Med.* 28: 1169—1178.
- GARCÍA-COLUNGA, J. y Miledi, R. (1994). Serotonergic agents block neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in oocytes. *FASEB J.* 8: 622 (abstract)
- GARCÍA-COLUNGA, J. y Miledi, R. (1995). Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 92: 2919-2923.
- GARCÍA-COLUNGA, J. y Miledi, R. (1996). Serotonergic modulation of muscle acetylcholine receptors of different subunit composition. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 93: 3990-3994.

- GARCÍA-COLUNGA, J. y Miledi, R. (1999). Blockage of mouse muscle nicotinic receptors by serotonergic compounds. *Exp. Physiol.* 84: 847-864.
- GARCÍA-COLUNGA, J., Awad, J. N. y Miledi, R. (1997a). Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl Acad. Sci USA.* 94: 2041-2044.
- GARCÍA-COLUNGA, J., Awad, J. N. y Miledi, R. (1997b). Blockage of muscle acetylcholine receptors by the serotonin 1A receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Biomed. Resch.* 18: 307-311.
- GELDER, M., Gath, D., Mayou, R y Cowen, P. (1996). Mood disorders, pp. 197-245. En: Oxford textbook of psychiatry, 3<sup>a</sup> Ed. . Oxford. New York, USA.
- GRASSI, F., Polenzani, A., Mileo, A. M. Caratsch, C. G., Eusebi, F. y Miledi, R. (1993). Blockage of nicotinic acetylcholine receptors by 5-Hydroxytryptamine. *J. Neurosci. Res.* 34: 562-570.
- HENNINGS, E. C. P., Kiss, J. P. y Vizi, E. S. (1997). Nicotinic acetylcholine receptor antagonist effect of fluoxetine in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 759: 292-294.
- HENNINGS, E. C. P., Kiss, J. P., De Oliveira, K., Toth, P. T. y Vizi, E. S. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor antagonistic activity of monoamine uptake blockers in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 73: 1043-1050.
- HERRERA, D., Mayet, L., Galindo, M. C. y Jung, H. (2000). Pharmacokinetics of a sustained-release dosage form of clomipramine. */ Clin Pharmacol.* 40: 1488-1493.

- HILLE, B. (1992). Ligand-gated channels of fast chemical synapses, pp 140-169. En: Ionic Channels of excitable membranes, 2<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- HOFFMAN, B. J., Hanson, S. R., Mezey, E. y Palkovits, M. (1998). Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in mammalian central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 19: 187-231.
- HOLLISTER, L. E. (1982). Plasma concentrations of tricyclic antidepressants in clinical practice. *J. Clin Psychiatry* **43**: 66-69.
- IVERSEN, S., Kupfermann, I. y Kandel, E. R. (2000). The autonomic nervous system and the hypothalamus, pp 961-981. En: Principles of neural science, 4<sup>a</sup> Ed. Kandel, E. R., Schwartz, J. M. y Jessell, T. M. McGraw-Hill, New York, USA.
- IZAGUIRRE, V., Fernández-Fernández, J. M, Ceña, V. y González-García, C. (1997). Tricyclic antidepressants block cholinergic nicotinic receptors and ATP secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Letters* **418**: 39-42.
- JARAMILLO, F., Vicini, S. y Schuetza, S. M. (1988). Embryonic acetylcholine receptors guarantee spontaneous contractions in rat developing muscle. *Nature* **335**: 66-68.
- KANDEL, E. R. y Siegelbaum, A. (2000a). Signaling at the nerve-muscle synapsis: directly gated transmission, pp 187-206. En: Principles of neural science, 4<sup>a</sup> Ed. Kandel, E. R., Schwartz, J. M. y Jessell, T. M. McGraw-Hill, New York, USA.
- KANDEL, E. R. y Siegelbaum, A. (2000b). Synaptic integration, pp 207-228. En: Principles of neural science, 4<sup>a</sup> Ed. Kandel, E. R., Schwartz, J. M. y Jessell, T. M. McGraw-Hill, New York, USA.

- KARLIN, A. y Akabas, M. H. (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptor and their cousins. *Neuron* 15: 1231-1244.
- KARSON, C. N., Newton, J. L., Livingston, R., Jolly, J. B., Cooper, T. B., Sprigg, J. y Komoroski, R. A. (1993). Human brain fluoxetine concentrations. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 5: 322-329.
- KATZ, B. and Thesleff, S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* **138**: 63-80.
- KORNHUBER, J., Retz, W. y Riederer, P. (1995). Slow accumulation of psychotropic substances in the human brain. Relationship to therapeutic latency of neuroleptic and antidepressant drugs?. *J. Neural Transm. Suppl.* 46:315-323.
- KUSANO, K., Miledi, R. y Strinnakre, J. (1997). Acetylcholine receptors in the oocyte membrane. *Nature* **270**: 739-741.
- LE NOVÉRE, N. y Changeux, J. P. (2001). The ligand gated ion channel database. *Nucleic Acids Res.* 29: 294-295.
- LEISCHOW, S. J. y Cook, G. (1999). Nicotine and non-nicotine formulations for smoking cessation, pp. 323-336. En: Neuronal nicotinic receptors. Arneric, S. P. y Brioni, J. D. (Eds). Wiley-Liss. New York, USA.
- LESTER, R. A. y Dani, J. A. (1995). Acetylcholine receptor desensitization induced by nicotine in rat medial habenula neurons. *J. Neurophysiol.* 74: 195-206.
- LINDSTROM, J (1999). Purification and cloning of nicotinic acetylcholine receptor, pp 3-23. En: Neuronal nicotinic receptors, Arneric, S. P. y Brionni, J. D. (Eds). Wiles-Liss, New York, USA.

- LINDSTROM, J. (2000). The structure of neuronal nicotinic receptors, pp **101**—146. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D. y Gottí, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlín.
- LUKAS, R. J. (1998) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors, pp 145-173. En: The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends. Barrantes, F. J., (Ed). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlin.
- MAGGI, L, Palma, E., Miledi, R. y Eusebi, F. (1998). Effects of fluoxetine on wild and mutant neuronal  $\alpha_7$  nicotinic receptors. *Mol. Psychiatry* 3: 350-355.
- MARCOURAKIS, T., Gorenstein, C, Ramos, R. T. y Da Motta Singer, T. (1999). Serum levéis of clomipramine and desmethylclomipramine and clinical improvement in panic díorder. *J. Psychopharmacol.* **13**: 40-44.
- MARTÍNEZ, P. M. y Villaroel, A. (1998). Canales iónicos dependientes de voltaje y ligando, pp. 155-180. En: Manual de neurociencias. Delgado, J. M., Ferrús, A., Mora, F. y Rubia, F. J. (Eds). Síntesis. Madrid, España.
- MIHAILESCU, E. y Drucker-Colín, R. (2000). Nicotine, brain nicotinic receptors, and neuropsychiatric disorders. *Arch. Med. Res.* **31**: 131-144.
- MILEDI, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. B* **215**: 491-497.
- MILEDI, R. y Woodward, R. M. (1989). Effects of defolliculation on membrane current responses oí *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **416**: 601-621.
- MISHINA, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Numa, S. Methfessel, C y Sakmann B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* **321**: 406-411.

- MORENO, R. A., Moreno, D. J. y Brito de Macedo Soares, M. (1999). Psicofarmacología de antidepresivos. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 21: S1 24-S1 40.
- Ni, Y. G. y Miledi, R. (1997). Blockage of 5HT<sub>2C</sub> serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 2036-2041.
- OWENS, M. J., Morgan, W. N., Plott, S. J. y Nemeroff, C. B. (1997). Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **283**: 1305-1322.
- PALMA, E., Bambino, L., Eusebi, F. y Ballivet, M. (1999). Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the  $\alpha 7$  and  $\beta 3$  subunits. *J Biol Chem.* 274: 18335-18340.
- PATERSON, D. y Nordberg, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* 61: 75-111.
- PICCIOTTO, M. R., Calderone, B. J., King, S. L. y Zachariou, V. (2000). Nicotinic receptors in brain: links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacol* **22**: 451-465.
- PRINCE, R. J. y Sine, S. M. (1998). The ligand binding domains of the nicotinic acetylcholine receptor, pp 31-53. En: The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends. Barrantes, J. F. (Ed). Springer-Verlag, Heidelberg /Berlin.
- RANA, B., McMorn, S. O., Reeve, H. L., Wyatt, C. N., Vaughan, P. F. T. y Peers, C. (1993). Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by imipramine and desimipramine. *Eur. J. Pharmacol.* **250**: 247-251.

- REÍD, I. C. y Stewart, C. A. (2001). How antidepressants work: new perspectives on the pathophysiology of depressive disorder. *Br. J. Psychiatry* **178**: 299-303.
- RICHELSON, E. (1994). Pharmacology of antidepressants-characteristics of the ideal drug. *Mayo Clin. Proc.* 69: 1069-1081.
- RICHELSON, E. (1996). Synaptic effects of antidepressants. *J. Clin. Psychopharm.* 16 Suppl. 2: 1S-9S.
- RICHELSON, E. (1999). Basic neuropharmacology of antidepressants relevant to the pharmacotherapy of depression. *Clin. Cornerstone* 1: 17-27.
- RICHELSON, E. y Nelson, A. (1984). Antagonism by antidepressants of neurotransmitter receptors of normal human brain *in vitro*. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **230**: 94-102.
- SALÍN PASCUAL, R. J. (1997). Neurobioquímica de la depresión, pp 95-114. En: Bases bioquímicas y farmacológicas de la neuropsiquiatría. McGraw-Hill/Interamericana. Distrito Federal, México.
- SALÍN-PASCUAL, R. J., Rosas, M., Jiménez-Genchi, A., Rivera-Meza, B. L. y Delgado-Parra, V. (1996). Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in non smoking patients with major depression. *J. Clin. Psychiatry* 57:387-389.
- SARGENT, P. B. (2000). The distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors, pp 163-184. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlin.
- SCHOFIELD, G. G., Witkop, B., Warnick, J. E. y Albuquerque, E. X. (1981). Differentiation of the open and closed states of the ionic channels of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants. *Proc. Natl Acad. Sci USA.* **78**: 5240 - 5244.

- SOREQ, H. y Seidman, S. (1992). *Xenopus oocyte: from gene to protein*, pp 225-265. En: *Ion Channels, methods in enzymology*, Vol. 207. Academic Press, New York, USA.
- STAHL, S. M. (2000). *Essential psychopharmacology*. 2<sup>a</sup> Ed. pp 199-295, Cambridge University Press, New York, USA.
- TAYLOR, P-, Osaka, H., Molles, B., Keller, H. y Malany, S. (2000). Contributions of studies of the nicotinic receptor from muscle to defining structural and functional properties of ligand-gated ion channels, pp 79-100. En: *Neuronal nicotinic receptors*. Clementi, F., Fornasari, D y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlín.
- UNWIN, N. (1995). Acetylcholine receptor channel in the open state. *Nature* **373**: 37<sup>^</sup>3.
- UNWIN, N. (2000). The croonian lecture 2000. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of fast synaptic transmission. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **355**: 1813-1829.
- VETULANI, J. y Nalepa, I. (2000). Antidepressants: past, present and future. *Eur. J. Pharmacol.* **405**: 351-363.
- VILLARROEL, A. (1998). Ion conduction through the acetylcholine receptor channel, pp 109-130. En: *The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends*. Barrantes, J. F (Ed). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlin.
- WEIGMANN, H., Härter, S., Bagli, M. y Hiemke, C. (2000). Steady state concentrations of clomipramine and its major metabolite desmethylclomipramine in rat brain and serum after oral administration of clomipramine. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10: 401—405.

- WILSON, G. G. y Karlin, A. (2001). Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 98: 1241-1248.
- WOODHULL, A. M. (1973). Ionic blockage of sodium channels in nerve. «*J. Gen. Physiol.* 61: 687-708.
- ZOLI, M. (2000). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in development and aging, pp. 213-237. En: Neuronal nicotinic receptors. Clementi, F., Fornasari, D y Gotti, C. (Eds). Springer Verlag, Heidelberg/ Berlin.
- ZWART, R. and Vijverberg, H. P. M. (1997). Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects. *Mol Pharmacol.* 52: 886-895.

**ORIGINAL RESEARCH ARTICLE**

# Antagonism of nicotinic acetylcholine receptors by inhibitors of monoamine uptake

•E López-Valdés and J García-Colunga

Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Juriquilla, Querétaro 76001, México

A study was made of the effects of several monoamine-uptake inhibitors on membrane currents elicited by acetylcholine (ACh-currents) generated by rat neuronal  $\alpha 2/4$  and mouse muscle nicotinic acetylcholine receptors (AChRs) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. For the two types of receptors the monoamine-uptake inhibitors reduced the ACh-currents albeit to different degrees. The order of inhibitory potency was norfluoxetine > clomipramine > indatraline > fluoxetine > imipramine > zimelidine > 6-nitro-quipazine > trazodone for neuronal  $\alpha 2/4$  AChRs, and norfluoxetine > fluoxetine > imipramine > clomipramine > indatraline > zimelidine > trazodone > 6-nitro-quipazine for muscle AChRs. Thus, the most potent inhibitor was norfluoxetine, whilst the weakest ones were trazodone, 6-nitro-quipazine and zimelidine. Effects of the tricyclic antidepressant imipramine were studied in more detail. Imipramine inhibited reversibly and non-competitively the ACh-current with a similar inhibiting potency for both neuronal  $\alpha 2/4$  and muscle AChRs. The half-inhibitory concentrations of imipramine were  $3.65 \pm 0.30 \mu\text{M}$  for neuronal  $\alpha 2/4$  and  $5.57 \pm 0.19 \mu\text{M}$  for muscle receptors. The corresponding Hill coefficients were 0.73 and 1.2 respectively. The inhibition of imipramine was slightly voltage-dependent, with electric distances of -0.10 and -0.12 for neuronal  $\alpha 2/4$  and muscle AChRs respectively. Moreover, imipramine accelerated the rate of decay of ACh-currents of both muscle and neuronal AChRs. The ACh-current inhibition was stronger when oocytes, expressing neuronal  $\alpha 2/4$  or muscle receptors, were preincubated with imipramine alone than when it was applied after the ACh-current had been generated, suggesting that imipramine acts also on non-activated or closed AChRs. We conclude that monoamine-uptake inhibitors reduce ACh-currents and that imipramine regulates reversibly and non-competitively neuronal  $\alpha 2/4$  and muscle AChRs through similar mechanisms, perhaps by interacting externally on a non-conducting state of the AChR and by blocking the open receptor channel complex close to the vestibule of the channel. These studies may be important for understanding the regulation of AChRs as well as for understanding antidepressant- and side-effects of monoamine-uptake inhibitors. *Molecular Psychiatry* (2001) 6, 511-519.

Keywords: serotonin transporters; antidepressants; cholinergic-serotonergic interaction; nicotinic receptor modulation; *Xenopus* oocytes

## Introduction

Nicotinic acetylcholine receptors (AChRs) mediate the transmission of signals across the vertebrate neuromuscular junction as well as across central and peripheral synapses.<sup>1</sup> The AChR, a ligand-gated ion channel opened by acetylcholine, is a pentameric structure, composed of four different subunits in muscle receptors ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ , or  $\delta$ , and  $\epsilon$ ) with a stoichiometry of 2:1:1:1; whereas in neuronal  $\alpha 2/4$  AChRs the stoichiometry is presumably 2:3.<sup>2,3</sup> The function of AChRs is

modified by both endogenous and exogenous substances.<sup>4,5</sup>

Although serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) acts as neurotransmitter on specific receptors,<sup>6</sup> it has been shown that 5-HT is also able to modulate AChRs. Furthermore, various agonists and antagonists of different 5-HT receptors, as well as inhibitors of the 5-HT-transporter alter the function of neuronal and muscle AChRs.<sup>7,17</sup> The most common action of serotonergic compounds on AChRs appears to be a non-competitive inhibitory process through interactions with the open channel.<sup>7,14</sup>

On the other hand, it is known that different classes of inhibitors of monoamine-uptake systems, that are used clinically as antidepressants, interact with different membrane proteins at synaptic regions. For example: imipramine, trazodone, clomipramine, zimelidine, fluoxetine and norfluoxetine inhibit a wide variety of receptors including muscarine, histamine, adre-

Correspondence: J García-Colunga, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Apartado Postal 1-1141, Juriquilla, Querétaro 76001, México. E-mail: garciac@icallj.cnb.inam.mx

Received 6 November 2000; revised 18 January 2001; accepted 24 January 2001

TESIS CON  
FATA DE CONTENIDO

naline, dopaminergic and serotonin receptors,<sup>18</sup> and they also inhibit biogenic amine transporters.<sup>19</sup> In addition, fluoxetine, an antidepressant that initially was thought to be a very highly selective inhibitor of the 5-HT uptake system,<sup>20</sup> inhibits nicotinic and serotonin receptors.<sup>11,13,21,22</sup> Similarly, imipramine, a non-selective inhibitor of serotonin uptake<sup>3</sup> blocks nicotinic receptors of frog motor endplate and electric organ in a non-competitive and voltage-dependent way,<sup>24,23</sup> inhibits the current evoked by dimethylphenylpiperazine in human neuroblastoma cells and blocks the secretion of ATP mediated by AChRs in chromaffin cells.<sup>27</sup>

In this paper, we studied effects of various inhibitors of monoamine transporters on neuronal  $\alpha 2/3$  and muscle AChRs, with emphasis on the mechanisms of action of imipramine.

### Materials and methods

The experiments were performed on *Xenopus* oocytes expressing rat neuronal  $\alpha 2/3$  or embryonic mouse muscle AChRs.<sup>11</sup> Briefly, oocytes were dissected from the ovary and maintained at 16°C in Barth's solution containing: 80 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.41 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.82 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2.4 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM HEPES (pH 7.4; NaOH), and 0.1 mg  $\text{ml}^{-1}$  gentamicin sulfate. The next day individual oocytes were injected with 0.5-5 ng of a mixture of cRNA subunits in a volume of 50 nl water (al, 1/31, -y and \*5 or ni and (34). Two days later the oocytes were treated with 140 units  $\text{ml}^{-1}$  collagenase type I (Sigma, St Louis, MO, USA) for 0.5-1 h to remove the ovarian interstitial and follicular cells.<sup>28</sup> Membrane currents were recorded 3-9 days after RNA injection using a voltage clamp technique with two microelectrodes<sup>29,30</sup> with a commonly available amplifier (Warner OC-725A; Warner Instruments Corp. Hamden, CT, USA), interfaced with an oscilloscope (Nicolet 310; Nicolet Instrument Corp. Madison, WI, USA) and stored in discs for subsequent analysis using a program written by Rico Mendi. The oocytes were continuously superfused at room temperature (20-23°C) with frog Ringer's solution containing 115 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM HEPES (pH 7.0; NaOH). Unless otherwise indicated, the oocyte membrane potential was maintained at -60 mV. Monoamine-uptake inhibitors were obtained from RBI (Natick, MA, USA). ACh and other drugs were diluted in Ringer and applied onto the oocytes by superfusion at a rate of 7-10  $\text{ml} \text{ min}^{-1}$  (chamber volume ~0.1 ml). Membrane current values are given as the mean  $\pm$  standard error (SE).

The dose-response relationships for ACh currents in the presence of imipramine were obtained by fitting the data with the Hill equation:

$$I_{\text{imp}} = I_p \text{MC}_{50}^{\text{nH}} / ([\text{imipramine}]^{\text{nH}} + \text{IC}_{50}^{\text{nH}}), \quad (1)$$

where  $I_{\text{imp}}$  is the ACh-current amplitude in the presence of imipramine,  $I_p$  is the control peak current,  $\text{IC}_{50}$  is the half-inhibitory concentration of imipramine, and nH is the Hill coefficient.

The dose-response relationships for ACh alone or for

ACh plus imipramine were obtained by fitting the data with the Hill equation:

$$I_{\text{ACh}} = I_{\text{max}} * \text{EACH}^{\text{nH}} / ([\text{ACh}]^{\text{nH}} + \text{EC}_{50}^{\text{nH}}), \quad (2)$$

where  $I_{\text{ACh}}$  is the ACh dose-dependent current amplitude in the absence or presence of imipramine,  $I_{\text{max}}$  is the amplitude of the maximal ACh-current,  $\text{EC}_{50}$  is the half-excitatory concentration of ACh, and nH is the Hill coefficient.

To determine if the imipramine-binding site of AChR is located externally or within the ion channel a one-site blockage model was used.<sup>11,31</sup> It assumes that the block caused by the drug is fast. The voltage dependence of the binding of the blocking agent is also related with the electrical distance of its binding site measured from the external side of the membrane channel, and is given by the equation:

$$\text{IC}_{50}(V) = \text{IC}_{50}(0) * \exp(dzFV_m/RT), \quad (3)$$

where  $\text{IC}_{50}(V)$  is the half-blocking concentration at 0 mV,  $V_m$  is the applied membrane potential,  $d$  is the fraction of the electrical field sensed at a binding site of imipramine within the receptor's ion channel,  $z$  is the valence of the blocking molecule,  $F$  is the Faraday constant,  $R$  is the gas constant, and  $T$  is the absolute temperature. Combining Equation (3) with the Hill equation for the blocking, Equation (1), gives:

$$[\text{imipramine}] / \text{IC}_{50}(0) * \exp(dzFV_m/RT), \quad (4)$$

Equation (4) was linearized to fit the data in a voltage range of -140 to -50 mV.

The time course of the decay of the ACh-current is influenced by several factors including the speed of the solution exchange, the size of the cell and the receptor desensitization<sup>11</sup> and can be fitted by the function:

$$I(t) = I_{\infty} + A_f \exp(-t/\tau_f) + A_s \exp(-t/\tau_s), \quad (5)$$

where  $I(t)$  is the current at time  $t$ ;  $I_{\infty}$  is an asymptotic component;  $A_f$  and  $A_s$  are the amplitudes for a fast and a slow component; and  $\tau_f$  and  $\tau_s$  are their respective time constants.

### Results

#### ACh-current decrease by monoamine-transporter inhibitors

Several monoamine-transporter inhibitors were tested on neuronal  $\alpha 2/3$  and muscle AChRs expressed in *Xenopus* oocytes. Control ACh-currents were elicited by low concentrations of ACh and after the peak had been reached, 10  $\mu\text{M}$  of a monoamine-transporter inhibitor was coapplied with ACh. After 2 min the inhibitor was removed, to allow recovery of the ACh-current (Figure 1). The effect of each compound was estimated as the ratio between the current elicited by ACh plus the drug over the control ACh-current value at the end of the drug application, giving the fraction of the ACh-current that remains at this time (Figure 1e).

These experiments disclosed two groups of com-

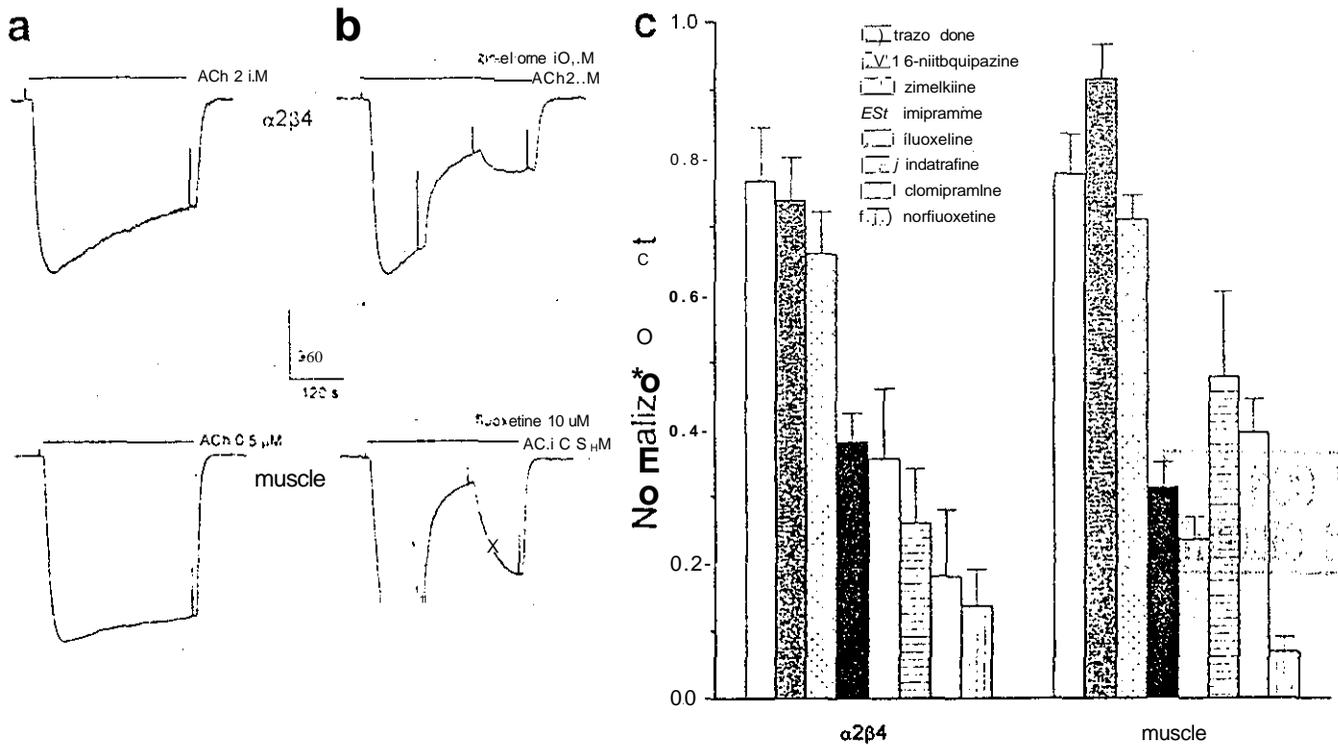


Figure 1. ACh-current inhibition by monoamine-transporter inhibitors. Control ACh-currents (a) and effects of zimelidino and fluoxetine on the ACh-currents from neuronal  $\alpha_2\beta_4$  and muscle AChRs respectively (b). Bar graph (c) shows the effects of zimelidino and fluoxetine on the ACh-currents from neuronal  $\alpha_2\beta_4$  and muscle AChRs respectively. The height of the columns indicates the fraction of ACh-current remaining after 10  $\mu$ M application of monoamine-uptake inhibitor. The number of oocytes recorded was  $n = 1-10$  for neuronal  $\alpha_2\beta_4$  and  $n = 4-7$  for muscle AChRs.

poutul?. The first group included the most potent ACh-current inhibitors: trazodone, zimelidino, and fluoxetine. The second group was constituted by the most potent ACh-current inhibitors: imipramine, clomipramine, indatrafine, and norfluoxetine. The third group included the most potent ACh-current inhibitors: imipramine, clomipramine, indatrafine, and norfluoxetine.

After this brief review, we focused on the effects of imipramine, that is used as antidepressant and is also considered as a reference drug in clinical studies.<sup>32</sup>

#### ACh-current inhibition by imipramine

When imipramine was applied alone (at concentrations up to 10  $\mu$ M) to injected or non-injected oocytes, no measurable membrane currents were observed. However, imipramine, at concentrations above 100 nM, inhibited rapidly and partially reversibly ACh currents in oocytes expressing AChRs (Figure 2a). The extent of inhibition and recovery of the ACh-current depended on the dose of imipramine (Figure 2b); at high imipramine concentrations the inhibition is more potent and the recovery is slower. The half-inhibitory concentrations,  $IC_{50}$ , of imipramine, calculated from Equation 1, were  $3.65 \pm 0.30 \mu$ M

( $n = 5-7$ ) for neuronal  $\alpha_2\beta_4$  and  $5.57 \pm 0.19 \mu$ M ( $IC_{50} = 4-7$ ) for muscle AChRs. The corresponding Hill coefficients were  $0.73 \pm 0.04$  and  $1.20 \pm 0.03$ , suggesting that imipramine interacts with AChRs at a single site.

#### Non-competitive inhibition of AChRs by imipramine

We examined two forms of applying imipramine to oocytes expressing either neuronal  $\alpha_2\beta_4$  or muscle AChRs. In one, the oocyte was superfused simultaneously with ACh and imipramine. In the other, the oocyte was preincubated with imipramine for 2 min and then the ACh and imipramine were coapplied. In both cases the concentration of imipramine was maintained constant and the ACh concentration was changed to obtain the full dose-response relationship (Figure 3). With both procedures the level of ACh-current inhibition was insurmountable by increasing ACh concentration and this inhibition was also independent of the concentration of ACh.

ACh dose-current response relationships were fitted with Equation 2. The half-effective concentrations,  $EC_{50}$  of ACh and the Hill coefficients,  $n_H$ , were obtained when oocytes were superfused with ACh alone, simultaneously superfused with ACh plus imipramine and preincubated with imipramine (Table 1). For both types of AChRs the  $EC_{50}$  increased approximately twice in the presence of imipramine without

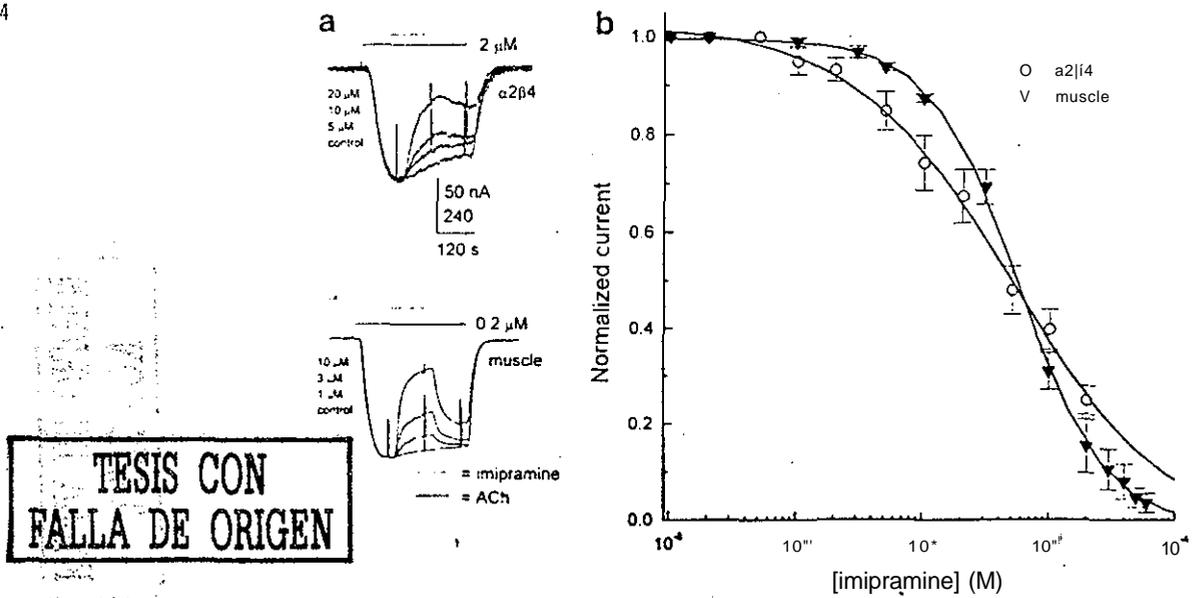


Figure 2 Imipramine concentration dependence of the ACh-current inhibition. (a) Superimposed records of the control ACh current and ACh-currents in the presence of the indicated concentrations of imipramine on neuronal  $\alpha 2\beta 4$  and muscle AChRs (b) Imipramine dose-response relationships of ACh-current inhibition obtained from records as in (a). The currents inhibited by imipramine were normalized to control ACh-currents. Continuous lines were obtained by fitting the data with Equation 1. The number of oocytes recorded was  $n = 5-11$  for neuronal  $\alpha 2\beta 4$  and  $n = 4-7$  for muscle AChRs.

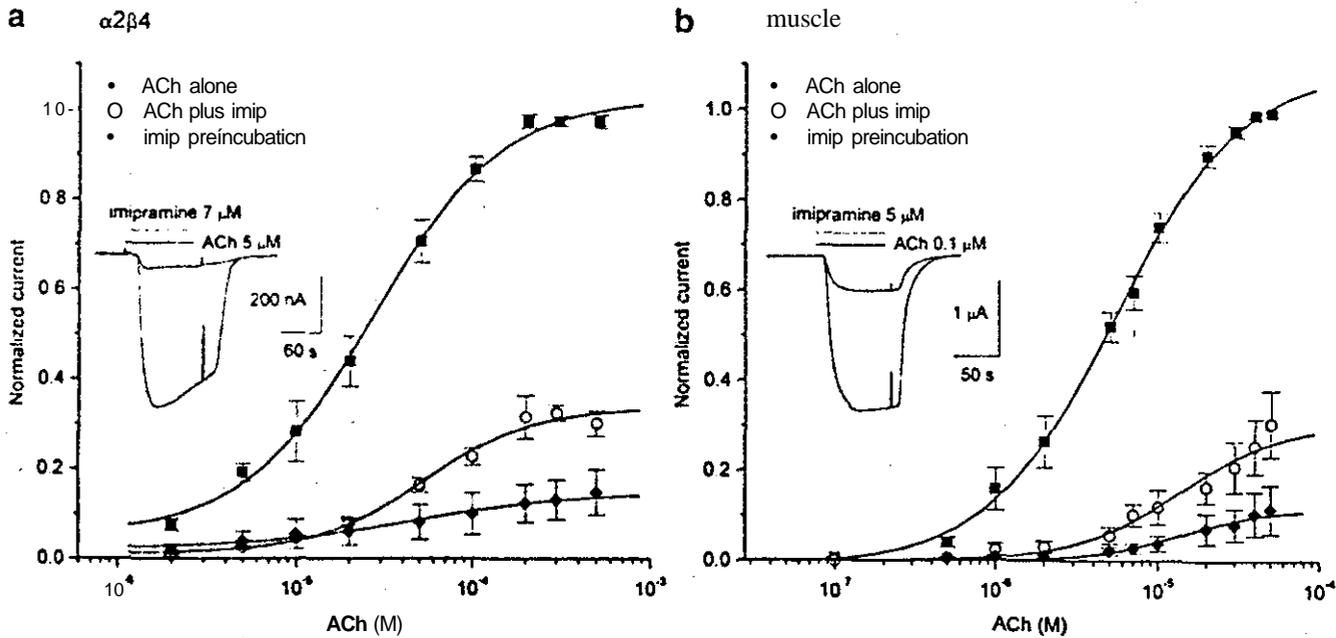


Figure 3 Non-competitive inhibition of AChRs by imipramine. ACh dose-response relationships were obtained with ACh alone and with ACh plus imipramine, on neuronal  $\alpha 2\beta 4$  (a) and muscle (b) AChRs. The imipramine was applied simultaneously with or before ACh (ACh plus imip or imip preincubation respectively). Data were normalized to the maximal control ACh current and fitted by using Equation 2 (continuous lines). Insets: Representative superimposed records of the control ACh current and that obtained by simultaneous application of drugs. The number of oocytes recorded was  $n = 4-9$  for neuronal  $\alpha 2\beta 4$  and  $n = 5-10$  for muscle AChRs (see Table 1).

changing the Hill coefficient, suggesting that the affinity of neuronal and muscle receptors for ACh is slightly reduced by imipramine, while maintaining normal cooperativity.

#### Additional forms of imipramine application

To explore if imipramine interacts with the closed and/or activated states of the AChR, effects of various forms of imipramine application to oocytes expressing

Table 1 The half-effective concentrations,  $EC_{50}$ , of ACh on neuronal and muscle AChRs

	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )	$n$
$\alpha 2/34$ AChRs		
ACh alone	$20.8 \pm 2.4$ ( $n = 9$ )	$1.2 \pm 0.1$
ACh plus imip $7 \mu M$	$51.4 \pm 4.1$ ( $n = 5$ )	$1.4 \pm 0.3$
Preincubation with imip $7 \mu M$	$41.2 \pm 1.4$ ( $n = 4$ )	$0.9 \pm 0.2$
muscle AChRs		
ACh alone	$5.3 \pm 0.3$ ( $r = 1U$ )	$1.1 \pm 0.1$
ACh plus imip $5 \mu M$	$13.6 \pm 1.3$ ( $n = 5$ )	$1.3 \pm 0.2$
Preincubation with imip $5 \mu M$	$13.8 \pm 1.2$ ( $n = 5$ )	$1.6 \pm 0.2$

The  $EC_{50}$  values of  $KCl$ , and  $nH$  were obtained from Figure 2. The application of ACh and imipramine (imip) was simultaneous.  $n =$  number of oocytes studied.

Whether  $\alpha 2/34$  or muscle AChRs were tested (Figure 4). Following two control applications of ACh the oocyte was preincubated briefly with imipramine and then exposed to ACh alone: (a) the imipramine was applied after the ACh-current had reached its peak (b); the imipramine current was elicited by simultaneous superfusion of ACh and imipramine (c); and the oocyte was preincubated with imipramine and then exposed simultaneously to ACh plus imipramine; (d). It is interesting

Table 2 Percentage of inhibition by different forms of imipramine application on neuronal and muscle AChRs

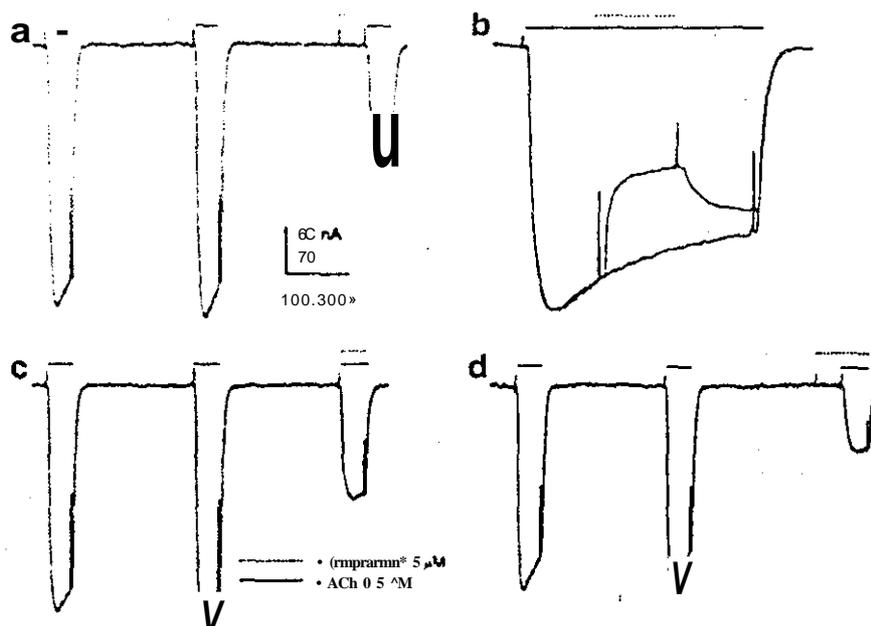
Type of application	$\alpha 2/34$ AChRs	muscle AChRs
imip, ACh	$42.6 \pm 8.3$ ( $n = 6$ )	$42.8 \pm 2.7$ ( $n = 4$ )
ACh, ACh + imip, ACh	$48.9 \pm 4.8$ ( $n = 5$ )	$44.2 \pm 4.5$ ( $n = 4$ )
ACh + imip	$56.9 \pm 7.5$ ( $n = 7$ )	$51.1 \pm 6.5$ ( $n = 4$ )
imip, ACh + imip	$70.6 \pm 3.8$ ( $n = 6$ )	$71.7 \pm 1.7$ ( $n = 4$ )

The membrane current was elicited by  $0.5 \mu M$  ACh and inhibited by  $4 \mu M$  imipramine for neuronal  $\alpha 2/34$  and  $5 \mu M$  imipramine for muscle AChRs.  $n =$  number of oocytes studied.

to note that when imipramine was applied before ACh (Figure 4a), the ACh-current inhibition was similar to that obtained when imipramine was applied after activation of the AChRs (cf Figure 4b, c). In contrast, preincubation with imipramine, followed by coapplication with ACh resulted in the strongest inhibition of the ACh-current (Figure 4d). These results (summarized in Table 2) suggest that imipramine interacts with both resting and activated AChRs.

#### Voltage-dependence of AChR inhibition by imipramine

To determine if imipramine is interacting within the ion channel or externally we studied the ACh-current inhibition as a function of membrane potential. Figure 5a shows a typical effect of  $10 \mu M$  imipramine on the membrane current elicited by  $0.5 \mu M$  ACh in an



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figure 4 Different forms of imipramine application on muscle AChRs. Control currents were elicited with  $0.5 \mu M$  ACh alone, then  $5 \mu M$  imipramine was applied in different ways: preincubating the oocyte and then ACh was applied alone (a); in the continuous presence of ACh after the peak control current was reached (b); simultaneously with ACh (c); before the current was elicited by ACh in the presence of imipramine (d). The bar calibration corresponds to  $50$  nA and  $300$  s (a, c and d) and  $70$  nA and  $100$  s (b). The number of oocytes recorded was  $n = 5-7$  for neuronal  $\alpha 2/34$  and  $n = 4$  for muscle AChRs (see Table 2).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

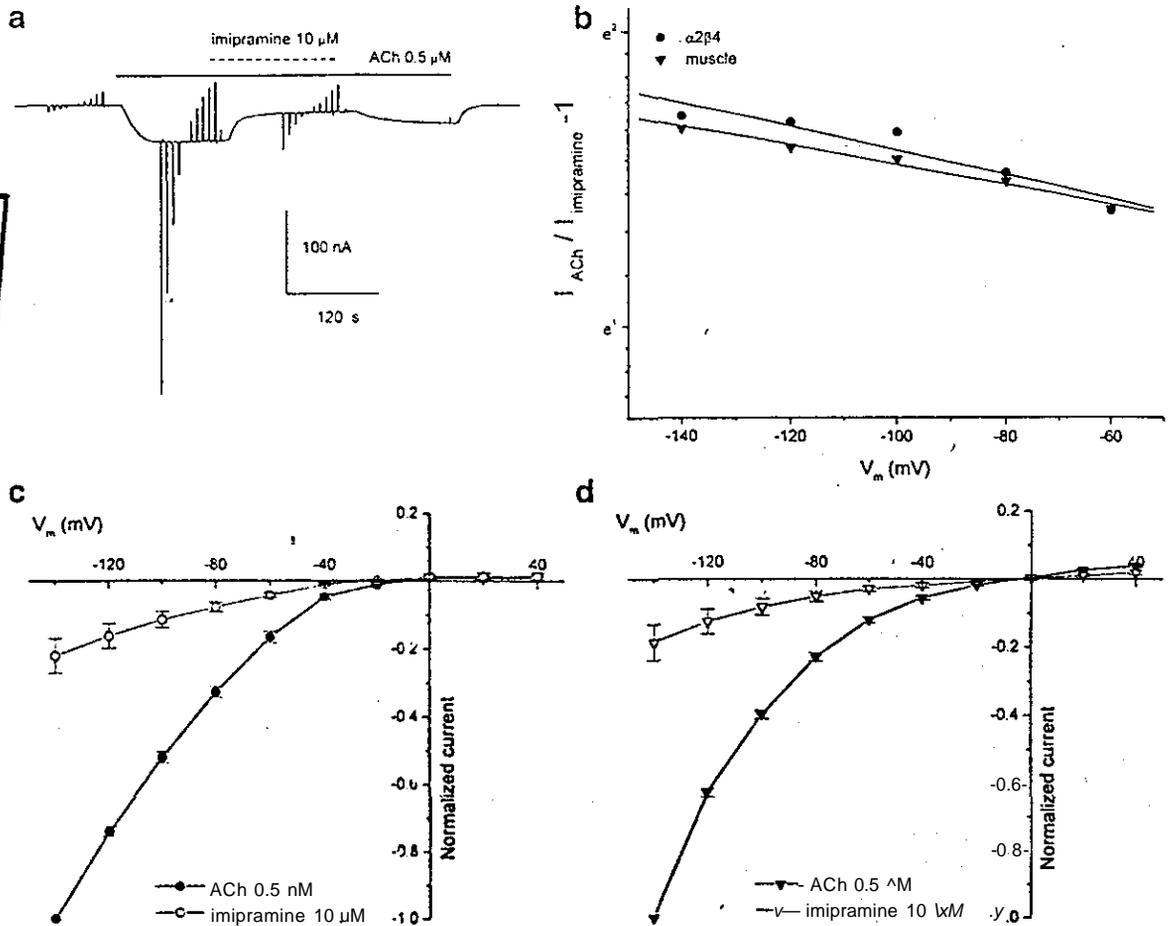


Figure 5 Voltage dependence of the ACh-current inhibition. (a) Representative current elicited by ACh alone and then inhibited by imipramine on muscle AChRs. The membrane potential was held at -60 mV and 20-mV voltage pulses were applied from -140 to 40 mV, in normal Ringer solution, during ACh superfusion, and during coapplication of ACh and imipramine. [b] ACh-current inhibited by imipramine as a function of membrane potential in muscle and neuronal AChRs. The continuous lines were obtained by fitting a one-site blocking model (Equation A). (c) I-V relationships are shown in the absence and presence of imipramine for neuronal α2/34 AChRs. (d) I-V relationships are shown for muscle AChRs. ACh-currents were normalized to the control ACh-currents at -140 mV. The number of oocytes recorded was  $n = 7$  for neuronal α2/34 and  $n = 6$  for muscle AChRs.

oocyte expressing muscle AChRs. The membrane potential was held at -60 mV and voltage pulses to different levels (from -140 to 40 mV in 20-mV steps) were applied before and during ACh application, as well as in the presence of imipramine plus ACh. The results were analyzed using a simple one-site blocking model,<sup>10,30</sup> that allows estimation of the 'electrical distance' (Equation 4). In oocytes expressing neuronal α2/34 or muscle AChRs, the ACh-current in the presence of imipramine ( $I_{ACh,pr}$ ) was compared with the control current ( $I_{ACh}$ ) at each membrane potential (Figure 5b). For both types of receptors the inhibition of ACh-current by imipramine was voltage-dependent, being stronger at hyperpolarized holding potentials. In the case of neuronal α2/34 AChRs the calculated electrical distance was  $0.10 \pm 0.02$  ( $n = 7$ ), whereas for muscle AChRs it was  $0.12 \pm 0.02$  ( $n = 6$ ), indicating that imipramine interacts within the pore of the receptor-channel complex, close to its extracellular end. The half-inhibitory concentration of imipramine at a membrane

potential of 0 mV,  $IC_{50}(0)$ , was 1.21 μM for α2β4 AChRs, whilst it was 3.61 μM for muscle AChRs. In contrast, the values of  $IC_{50}$  at -60 mV were similar for both types of receptors (Figure 2b). Current-voltage (I-V) relationships for neuronal α2/34 and muscle AChRs (Figure 5c, d) show an inward rectification that decreased slightly by imipramine.

#### Effects of imipramine on the decay of the ACh-current

To explore the possibility that imipramine modifies the desensitization of AChRs, effects of imipramine on the decay of the ACh-currents were studied in oocytes expressing neuronal or muscle AChRs. The control membrane current was elicited by 100 μM or 5 μM ACh: for neuronal α2β4 or muscle AChRs respectively. In both cases the control current reached a peak and then declined in the continuous presence of ACh, and the time-course of decay followed an exponential function. This decay is due to several factors such as the

- 5 Arias HR. Binding sites for exogenous and endogenous non-compellible: inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1376: 173-220.
- 6 Hamos NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Xenopharmacology* 1999; 38: 1083-1152.
- 7 Grassi F, Polenzani L, Milco AM, Caratschi CG, Tusebi F, Milei R. Blockage of nicotinic acetylcholine receptors by 5-hydroxytryptamine. *Scuroscias* 1993; 34: 562-570.
- 8 (JJ) reia-Col miga J, Müedi R. Serotonergic agents block neuronal nicotinic receptors expressed in oocytes. *FASEB J* 1994; 8: 022 (abstract).
- 9) f>d:ri:i-Cul... MiU'di K. Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J'roe Satl Acad Sci L'SA* 1997; 92: 2191-292.
- 10) i; jrc: i-t; -luiga ). Müedi K. Serotonergic modulation of muscle acetylcholine receptors of different Mibimit composition. *Proc Sall At:d Sii ISA* 1996; 93: 3990-3994.
- 11) (i;ru'ti-Giunga ). Milei R. Blockage of N1011S-<sup>\*</sup> muscle nicotinic receptors by serotoninergic compounds. *E.p Physiol* 1999; 84: 847-864.
- 12) Painn E, Milco AM, Kiischi F, Mik-di R'. Tereonine-for-leucine (Tiu)tion with (omán M2 of the neuronal nicotinic receptor (converts 3-indol-tryptamine from antagonist to agonist. *Proc Sall At:d Sci L'SA* 1997; 93: 11231-11235.
- 13) Clirt i; j-Coltin; . 1. Awad JN, Milei R. Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc X.-Al Amd Sci L'SA* 1997; 94: 2041-2044.
- 14) (s;ri:i;vColiini; ). Müedi R. Blockage of muscle acetylcholine receptors by the serotonin 1A receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)imidazo[5,1-f]pyridine (8-OH-DPAT). *Btonu-d Res* 1999; 18: 307-311.
- 15) P.ñi.1 F. M.ñi. L. Eusebi F, Milei R. Neuronal nicotinic threonine-for-leucine-247 <sup>a7</sup> mutant receptors show different gating properties. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 1117-1124.
- 16) i; jrc: i-t; -luiga ). Müedi K. Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J'roe Satl Acad Sci L'SA* 1997; 92: 2191-292.
- 17) i; jrc: i-t; -luiga ). Müedi K. Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J'roe Satl Acad Sci L'SA* 1997; 92: 2191-292.
- 18) C. irV. . N>l-(! A. Ki h\*\*lfim E. Binding of antidepressants to neuronal nicotinic receptors: effects of newer generation compounds. *J'roe Satl Acad Sci L'SA* 1997; 92: 2191-292.
- 19) V.-\*n- VI. Xí.TV..H V.N. p.=< SI. N.itiwroff CB. Neurotransmitter Transporter-mediated uptake of fluoxetine: profile of antidepressants and their effects. *Pharmacol Ther* 1997; 2B3: 1305-1322.
- 20) Woigi 1)1. .;):ii>>ici FP. En>lc.T.in EA. Projeje (Fluoxetine). LiÚy 1U11401. ilc IUM .>!!< «.Totciin npt.ik» inhibitor and an antidepressant. *Ufe Sii* 1995; 57: 411-441.
- 21) Ni V(,; Mi!-di K. Úk-k k.ig< of M1T.; swotonin receptors by fluoxetine (t'mxji). *Pr\*. Siiil Acad Sci USA* 1997; tM: 203R-204O.
- 22) SSagii . P.ilm.i K. Milt <1; H. Eusebi F. Effects of fluoxetine on wild-type mutant neuronal nicotinic receptors. *Mol Psychiatry* 1998; 3: 350-355.
- 23) Richelson E. Synaptic effects of antidepressants. *Clin Psychopharmacol* 1996; 16 suppl 2: 1S-7S.
- 24) Aronstam RS. Interactions of tricyclic antidepressants with a synaptic ion channel. *Life Sci* 1981; 28: 59-64.
- 25) Eldefrawi ME, Warnick JE, Schofield GG, Albuquerque EX, Eldcrawi AT. Interaction of imipramine with the ionic channel of the acetylcholine receptor of motor endplate and electric organ. *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 1391-1394.
- 26) Rana B, McMorn SO, Reeve HL, Wyatt CN, Vaughan PFT, Peers C. Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by imipramine and desimipramine. *Eur J Pharmacol* 1993; 250: 247-251.
- 27) Jzsgvirre V, Fernández-Fernández JM, Ceña V, González-García C. Tricyclic antidepressants block cholinergic nicotinic receptors and ATP secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* 1997; 418: 39-42.
- 28) Milei R, Woodward RM. Effects of denervation on nicotinic current responses of *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 1989; 416: 601-621.
- 29) Milei R. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus hevis* oocytes. *Proc R Soc Lond* 1982; B 215: 491-497.
- 30) Woodhull AM. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* 1973; 61: 687-708.
- 31) Foltz A, Trautmann A. Interaction between nerve-released acetylcholine and benzylhexamethonium agonists at frog end-plate. *J Physiol (Lond)* 1980; 299: 533-552.
- 32) Garattini S, Barbui C, Saraceno B. Antidepressant agents: from tricyclics to serotonin uptake inhibitors. *Psychol Sied* 1998; 28: 1169-1178.
- 33) Zwart R, Vijverberg HPM. Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 886-895.
- 34) Le Novère N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 1995; 40: 155-172.
- 35) Eterovic VA, Li L, Ferchmin PA, Lee YH, Hann RM, Rodríguez AD *et al*. The ion channel of muscle and electric organ acetylcholine receptors: differing affinities for noncompetitive inhibitors. *C&E Mol Neurobiol* 1993; 13: 111-121.
- 36) Colomo F, Rabamimoff R, Stefani E. An action of S-hydroxytryptamine on the frog motor end-plate. *Eur J Pharmacol* 1968; 3: 272-274.
- 37) Akasu T, Koketsu K. 5-Hydroxytryptamine decreases the sensitivity of nicotinic acetylcholine receptor in bull-frog sympathetic ganglion cells. *J Physiol (Lond)* 1986; 380: 93-109.
- 38) Hahn SJ, Choi JS, Rhie D, Oh CS, Jo YH, Kim MS. Inhibition by fluoxetine of voltage-activated ion channels in rat PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 1999; 367: 113-118.
- 39) Hollister LE. Plasma concentration of tricyclic antidepressants in clinical practice. *Clin Psychiatry* 1982; 43: 66-69.
- 40) Bcsrrt L, Dttbruyno D, Riaux P, Bonvalot T, Moutin M, Zarifian E *et al*. A comprehensive investigation of plasma and brain regional pharmacokinetics of imipramine and its metabolites during and after chronic administration in the rat. *J Pharmacol Sci* 1996; 85: 291-295.
- 41) LiAas RJL. Culi lines as models for studies of nicotinic acetylcholine receptors. In: Arneric SP, Brioni JD (eds). *Neuronal Nicotinic Receptors*. Wiley-Liss: New York, 1999, pp 81-97.
- 42) Palerson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 2000; 61: 75-111.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

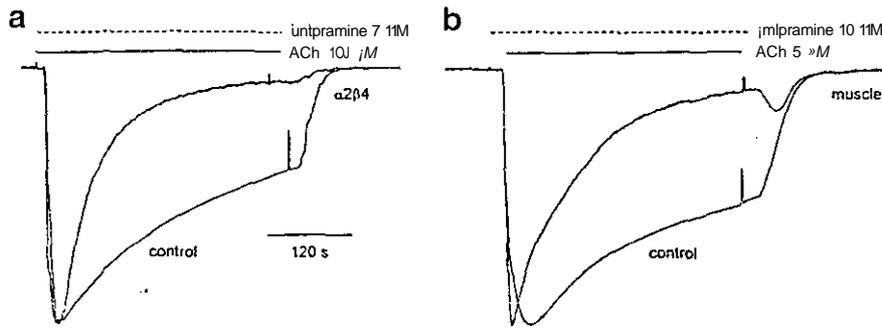


Figure G Imipramine accelerates the time course of the ACh-current. Records of the control current and that obtained in the presence of imipramine on neuronal  $\alpha 2/34$  (a) and muscle AChRs (b) are shown superimposed and normalized. Control current amplitudes were 4931 nA (a) and 54.8  $\mu$ A (b); whereas ACh-current amplitudes in the presence of imipramine were 1280 nA and 11.6  $\mu$ A respectively. The number of oocytes recorded was  $n = 4$  for neuronal  $\alpha 2/34$  and  $n = 6$  for muscle AChRs (see Table 3).

speed of the superfusion that determines the rate of solution exchange, the presence of unstirred layer close to the surface of the cell, the size and shape of the cell, desensitization of receptors. Considering that the first three of these factors are maintained constant during one experiment, we think that imipramine accelerates the decay of the ACh-current by blocking AChRs and accelerating the desensitization of receptors. For instance, when the ACh was simultaneously superfused with 7  $\mu$ M or 10  $\mu$ M imipramine (for neuronal  $\alpha 2/34$  or muscle AChRs), the peak current was substantially reduced and the rate of decay was accelerated (Figure 6). The averaged peak control current was 4.93  $\mu$ A for neuronal  $\alpha 2/34$  and 3-1.27  $\mu$ A for muscle AChRs; whereas the averaged peak ACh-current in the presence of imipramine was  $0.76 \pm 0.04$   $\mu$ A for neuronal  $\alpha 2/34$  and 8.97  $\mu$ A for muscle AChRs.

We compared the rate of ACh-current decay in the absence and presence of imipramine in two ways. Firstly, we defined  $D_{5\%}$  as the fraction of the ACh-current that was reduced after 5 min of the application of ACh alone or ACh plus imipramine, compared with its own peak current. This value was lower for control ACh-currents than for ACh-currents in the presence of imipramine, indicating less degree of decay in control ACh-currents and probably less desensitization (Table 3). Secondly, the current decay was fitted with

exponential functions (Equation 5). For both types of control ACh-currents the decay was well fitted by a single exponential function and a steady-state component. In contrast, in the presence of imipramine the ACh-current decayed biphasically, following the sum of two exponential functions and a steady-state component; where the two time constants of the decay were faster than the time constant of the corresponding control ACh-current (Table 3). These results suggest that imipramine might accelerate the desensitization of AChRs. Additionally, with high ACh concentrations, a transient tail current was elicited when ACh and imipramine were simultaneously washed out. This effect was more evident for muscle than for neuronal  $\alpha 2/34$  AChRs (Figure 6). However, when ACh was removed leaving the imipramine in the superfusing fluid, the transient inward current was not observed. This suggests a reversal of the open channel blockage by imipramine, similar to that seen with atropine and ACh itself.<sup>933</sup>

Discussion

The present study shows that several substances, used widely as antidepressants, have an inhibitory effect on the ACh-current generated by the activation of AChRs expressed in *Xenopus* oocytes.

Our results show that the imipramine exerts a non-

Table 3 Amplitudes and time constants of the components of the ACh-current decay of neuronal and muscle AChRs

Parameter	$\alpha 2/34$ AChRs (n = 4)		muscle AChRs (n = 6)	
	100 nM ACh	100 nM ACh + 7 $\mu$ M imip	5 $\mu$ M ACh	5 pM ACh + 10 $\mu$ M imip
$D_{5\%}$	0.62 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.08	0.36 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.03
L	0.18 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.00	0.45 $\pm$ 0.07	0.05 $\pm$ 0.04
$A_s$	0.83 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.10	1.54 $\pm$ 0.08	0.60 $\pm$ 0.11
$T_{(S)}$	220.2 $\pm$ 30.8	47.46 $\pm$ 20.90	126.9 $\pm$ 23.0	52.5 $\pm$ 25.0
A	-	0.41 $\pm$ 0.09	-	0.39 $\pm$ 0.06
	-	84.85 $\pm$ 28.40	-	95.2 $\pm$ 23.0

\*Amplitudes of the fast ( $A_s$ ) and slow ( $A_s$ ) components and the asymptotic component ( $L$ ) were normalized to the total current amplitude. The application of ACh and imipramine was simultaneous. n = number of oocytes studied.

FALTA DE ORIGEN

competitive inhibition on muscle AChRs. This result is in agreement with previous reports carried out on AChRs of the electric organ of *Torpedo* and frog muscle.<sup>24-25</sup> However, the location of the binding site of imipramine on these receptors is not clear. It has been proposed that the imipramine binding site is the same as that for phencyclidine and perhydrohistrionicotoxin, which is located within the channel,<sup>24</sup> in contrast with other studies suggesting that the binding site of imipramine, also located within the channel, is different.<sup>25</sup> On the other hand, the electrical distance for spiperone on muscle AChRs was  $cf = 0.17$ ,<sup>10</sup> similar to the value obtained here for imipramine ( $d = 0.12$ ), suggesting that both drugs interact at the same or closely related site of the muscle AChR.

In contrast to effects of imipramine that had no effect on current rise or decay times in frog motor endplate,<sup>25</sup> we observed that imipramine accelerates in a concentration-dependent manner the rate of decay of ACh currents generated by both neuronal and muscle AChRs. For instance, when the concentration of imipramine was increased the ACh-current decay, and probably its desensitization, became faster. The different results may be due to molecular differences in the M2 region between frog and mouse muscle AChRs,<sup>34</sup> similar to the difference in affinity to phencyclidine between AChRs from *Torpedo* electric organ and mouse muscle; which is based on a difference in three amino acids within the ionic channel.<sup>33</sup>

It has been reported that ACh potentiators in rat soleus muscle fibers are potentiated with 1  $\mu$ M imipramine.<sup>23</sup> However, under our experimental conditions even smaller concentrations of imipramine exerted an inhibitory effect on the ACh-current. Further studies are necessary to clarify these differences, which may be due to the different types of receptors and cells examined.

The non-competitive inhibition of both neuronal and muscle AChRs by imipramine shows that the drug exerts its effects by a steric mechanism with a similar affinity. Considering the electric distance ( $\sim 0.10$ ) for both types of receptors, it seems likely that the binding site of imipramine is within the ionic channel, close to its extracellular end, similar to the binding site of many non-competitive inhibitors, including chlorpromazine and histionicotoxin.<sup>3</sup> In addition, it appears that in both neuronal and muscle AChRs, imipramine binds to the resting receptor and prevents it from the opening of the ionic channel.

Nearly three decades ago it was reported that serotonin inhibits the AChRs of the neuromuscular junction.<sup>36</sup> This effect was subsequently widely confirmed for both muscle and neuronal AChRs.<sup>7,9,11,37</sup> Such a cross-interaction between serotonin and AChRs needs to be considered in explaining the varied effects of antidepressant drugs, bearing in mind that two inhibitory effects may occur on AChRs, one exerted by the antidepressant and the other by the non-competitive inhibitory effect of serotonin.

Few papers have studied effects of imipramine on muscle<sup>24-25</sup> and neuronal<sup>28-27</sup> AChRs. Here we com-

pleted previous studies and performed a comparative electrophysiological characterization of effects of imipramine on muscle and neuronal AChRs. A new finding was that imipramine acts on both types of AChRs through similar mechanisms, probably interacting within the ionic channel at the same site and accelerating the desensitization of AChRs. Also this is the first study in which effects of substances such as norfluoxetine, indatraline, zimelidine, 6-nitroquipazine and trazodone have been explored on nicotinic receptors.

It has become increasingly important to determine the effects of antidepressants on neurotransmitter receptors and ionic channels, because the role played by them on mental depression and other diseases is not completely understood. For instance, fluoxetine has an inhibitory effect on muscle as well as on neuronal AChRs,<sup>11-16,17,22</sup> histamine H<sub>1</sub>, adrenergic  $\alpha$  and  $\alpha$  and muscarinic receptors,<sup>18</sup> and voltage-activated K and Na<sup>+</sup> channels.<sup>38</sup>

Finally, it is possible that the actions of imipramine inhibiting neuronal AChRs, are related with therapeutic and/or side-effects, because the concentration of imipramine in blood of depressed patients may reach  $2 \mu$ M,<sup>3a</sup> and that the concentration in the brain is 11-16 fold higher,<sup>40</sup> compared with the IC<sub>50</sub> for imipramine (3.65  $\mu$ M) on neuronal  $\alpha$ 2 $\beta$ 4 AChRs studied here. Additionally, the demethylated metabolite of imipramine, desipramine, that is more concentrated in blood and brain than imipramine,<sup>10</sup> exerts a similar activity in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y.<sup>2</sup> These cells express AChR  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 7,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 4 subunit genes.<sup>41</sup> Thus, it is very likely that imipramine interacts with AChRs in the peripheral and central nervous systems. Further studies are required to clarify how AChRs are involved in a number of physiological and behavioral processes and how these drugs exert their action on other AChR subtypes.

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr Ricardo Miledi for initiating these experiments and for subsequent invaluable help during this work. We are also grateful to Drs J Boulter and J Heinemann (The Salk Institute) for providing the AChR clones, and MSc Marina Herrera González for preparing cRNAs. This work was supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (3717P-N9608 and G25775N (to JGC) and a DGEI UNAM scholarship to HELV).

#### References

- 1 Clementi F, Fomasai D, Goll C. Neuronal nicotinic receptors: important new players in brain function. *Eur J Pharmacol* 2000; 393: 3-1p.
- 2 Karlin A, Alebas MH. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Aburo* 1995; 13: 1231-1244.
- 3 McGhee DS. Molecular diversity of neural acetylcholine receptors. *Ann NY Acad Sci* 1999; 868: 565-577.
- 4 Lukas RJ, Bencherif M. Heterogeneity and regulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Int J Dev Neurobiol* 1992; 34: 25-131.