

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Localización de los neuroreceptores en la membrana  
sináptica y sus alteraciones por el efecto de anestésicos y  
detergentes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Santiago Aguilar Márquez**

Madrid, 2015

José Santiago Aguilar Márquez

TP  
1981  
144



X - 32 - 200 209 - 2

LOCALIZACION DE LOS NEURORRECEPTORES EN LA MEMBRANA  
SINAPTICA Y SUS ALTERACIONES POR EL EFECTO DE ANESTESICOS  
Y DETERGENTES

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1981



BIBLIOTECA

© José Santiago Aguilar Marquez  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-15930-1981

I

JOSE SANTIAGO AGUILAR MARQUEZ

LOCALIZACION DE LOS NEURORRECEPTORES EN LA MEMBRANA SINAPTICA  
Y SUS ALTERACIONES POR EL EFECTO DE ANESTESICOS Y DETERGENTES

Director: Jaime Monreal Llop

Investigador Científico del C.S.I.C. (Instituto Cajal)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica

Noviembre, 1980



A MIS PADRES



VºBºdel director:

*Juan Manuel*

Dr. J. Monreal :

VºBºdel ponente:

Prof. A.M. Municio



III

INDICE

TITULO.....	I
DEDICATORIA.....	II
INDICE.....	III
I-RESUMEN.....	1
II-INTRODUCCION.....	6
Estructura de la neurona.....	7
Bioquímica de la neurona.....	10
La membrana neuronal.....	13
Los receptores de membrana- Neurorreceptores.....	22
Localización de los neurorreceptores- Receptores pre- y postsinápticos.....	23
Enfoque bioquímico para el estudio de receptores pre- y postsinápticos- Objetivos y hallazgos.....	30
III-MATERIALES Y METODOS.....	37
1. Fraccionamiento subcelular.....	38
2. Microscopía electrónica de las fracciones subcelulares.....	39
3. Determinación de proteínas.....	40
4. Unión de ( <sup>3</sup> H)-DHE a las membranas sinaptosomales.....	41
5. Unión de ( <sup>3</sup> H)-naloxona a las membranas sinaptosomales.....	42
6. Unión de ( <sup>3</sup> H)-QNB a las membranas sinaptosomales.....	43
7. Unión de ( <sup>14</sup> C)-DMTC a las membranas sinaptosomales.....	44

#### IV

8. Acción de los detergentes sobre la unión de ( <sup>3</sup> H)-DHE, ( <sup>3</sup> H)-naloxona, y ( <sup>3</sup> H)-QNB a las membranas sinaptosomales.....	44
9. Aislamiento de los complejos sinápticos.....	45
10. Experimentos de protección.....	46
11. Efecto de los anestésicos sobre la unión de ( <sup>3</sup> H)-QNB a las membranas sinaptosomales crudas.....	47
12. Productos químicos.....	48
IV- RESULTADOS.....	49
1. Características de los receptores α-adrenérgicos centrales.....	50
2. Características de los receptores a los opiáceos.....	52
3. Características de los receptores colinérgicos muscarínicos.....	56
4. Efecto de los detergentes sobre los receptores centrales.....	59
5. Estabilidad del complejo ligando-receptor aislado.....	64
6. Localización pre- y postsináptica de receptores centrales.....	71
7. Protección del receptor muscarínico por la atropina.....	76
8. Acción de los anestésicos locales sobre la unión de ( <sup>3</sup> H)-QNB.....	81
V-DISCUSSION.....	92
1. Especificidad de la unión de los ligandos radioactivos a los distintos receptores.....	93

2. Efecto de los detergentes sobre la unión específica de los ligandos a los receptores.....	97
3. Localización pre- y postsináptica de los receptores.....	100
4. Protección del receptor muscarínico.....	107
5. Acción de los anestésicos locales sobre los receptores muscarínicos centrales.....	110
VI-CONCLUSIONES.....	116
A. Especificidad de la unión de ligandos a los neurorreceptores de las membranas sinaptosomales centrales.....	117
B. Efecto de los detergentes sobre la unión específica de los ligandos a los neurorreceptores.....	119
C. Localización de los neurorreceptores en las membranas sinaptosomales.....	120
D. Protección del receptor muscarínico.....	122
E. Efecto de los anestésicos locales sobre el receptor muscarínico.....	123
VII-BIBLIOGRAFIA.....	125
ABREVIATURAS.....	144
AGRADECIMIENTOS.....	146



## **I- RESUMEN**

Las neuronas son las células principales del sistema nervioso, y poseen una serie de características morfológicas y bioquímicas especiales destinadas al desempeño de su función en la conducción y transmisión del impulso nervioso. Entre estas características se incluyen una membrana celular capaz de conducir el impulso nervioso, de liberar neurotransmisores en la terminal axónica y de interaccionar con los mismos en la zona sináptica.

En la neurona, como en las demás células, la membrana está constituida por una bicapa lipídica con los lípidos orientados de forma que su región polar está en el lado externo y su parte hidrofóbica en el interior. A esta bicapa lipídica se unen las proteínas. Según la forma de unirse, las proteínas de la membrana se clasifican en periféricas, cuando están solamente en contacto con la superficie de la bicapa; y en intrínsecas cuando están incluidas en mayor o menor grado dentro de la bicapa.

La composición lipídica no difiere mucho en las diversas membranas. Lo que diferencia una membrana de otra son principalmente sus proteínas. Entre estas proteínas se encuentran los receptores que son capaces de interaccionar específicamente con determinadas sustancias que funcionan como mensajeros químicos provocando la respuesta de la célula blanco. En el sistema nervioso, cuando el impulso alcanza el terminal axónico, se liberan los neurotransmisores a la hendidura sináptica y estos interaccionan de forma específica con los neurorreceptores. Esta interacción da lugar a una serie de procesos físicos y químicos que llevan a la producción de un potencial de acción en la neurona postsináptica o en la célula efectora.

A parte de mediar la respuesta de la neurona o célula post-

sináptica, en los últimos años se ha podido comprobar que los neurorreceptores están también implicados en la regulación de la liberación del neurotransmisor. Este hecho llevó a postular la existencia de neurorreceptores en los terminales axónicos a los que se les dio el nombre de receptores presinápticos. Aunque cada vez es mayor la cantidad de resultados farmacológicos que apoyan la existencia de estos receptores, hasta el presente no había ningún dato bioquímico ni morfológico que demostrara la localización presináptica de los neurorreceptores.

Por este motivo, basándonos en estudios anteriores de microscopía electrónica, nos propusimos abordar con una metodología bioquímica el problema de la localización de los neurorreceptores con respecto a la región sináptica. Mediante un tratamiento suave con detergente la membrana presináptica puede ser disuelta quedando intacta la membrana postsináptica, lo que da lugar a un aumento en la concentración de los receptores cuando éstos están localizados postsinápticamente y a una disminución si su localización es también presináptica. Pudo demostrarse que este tratamiento produce un aumento en la unión específica de la droga nicotínica ( $^{14}\text{C}$ )-dimetil-d-tubocurarina. En cambio, hay una disminución en la unión de drogas  $\alpha$ -adrenérgicas, opiáceas y muscarínicas. Estos resultados sugieren que los receptores nicotínicos son fundamentalmente postsinápticos, mientras que los  $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y muscarínicos son parcialmente pre- y postsinápticos. De esta manera se aporta un dato estructural que explica la regulación por retroalimentación de la liberación del neurotransmisor observada en diversos experimentos farmacológicos.

Durante estos experimentos se estudiaron las propiedades de unión de las distintas drogas a las membranas sinaptosomales comprobándose que los detergentes podían alterar la unión de estas drogas a las membranas. A bajas concentraciones, algunos detergentes pueden producir una activación de la unión, mientras que a concentraciones altas todos ellos producen inactivación.

También pudo observarse que el efecto inhibitorio del Triton X-100 sobre los receptores muscarínicos es reversible a concentraciones de detergente menores de 0.01% e irreversible a concentraciones mayores de 0.1%. Esta inhibición irreversible es contrarrestada cuando se une al receptor un ligando específico, siendo la atropina el ligando más eficaz para impedir la inactivación. Estos estudios demuestran que es posible proteger el sitio receptor de la acción deletérea del Triton X-100 mediante la unión de un ligando específico y señala un camino a seguir para el aislamiento de receptores como entidades moleculares separadas de las membranas.

El efecto de los detergentes sobre los receptores nos llevó a estudiar la acción de los anestésicos locales, que, como los detergentes, disminuyen la viscosidad y expanden la membrana celular, y además tienen importancia terapéutica. Todos los anestésicos producen una inhibición del receptor muscarínico con una  $K_i$  en el intervalo micromolar. Dependiendo de la concentración de anestésico esta inhibición puede aparecer como competitiva o no-competitiva y no presenta cooperatividad con la unión de drogas muscarínicas. El efecto de los anestésicos es reversible y, a diferencia de las drogas muscarínicas, los anestésicos no protegen al receptor muscarínico de la acción deletérea del Triton X-100. Estos resultados su

gieren que los anestésicos inhiben el receptor muscarínico actuando sobre algún sitio accesorio pero no directamente sobre el sitio receptor.

## II- INTRODUCCION

Una de las características más notables de los seres vivos es su irritabilidad o capacidad de responder a los estímulos. En los animales superiores esta función se ejerce principalmente por intermedio del sistema nervioso cuyos componentes más importantes son las neuronas y las células gliales. Las neuronas son las células propiamente funcionales del sistema nervioso, es decir, las que son capaces de excitarse y originar una respuesta a un estímulo. La organización morfológica y el funcionamiento bioquímico de las neuronas son, en términos generales, similares a los que existen en las demás células del organismo. No obstante, también poseen características únicas destinadas a la realización de su función principal: la conducción y transmisión del impulso nervioso. Estas características especiales de las neuronas comprenden aspectos morfológicos y bioquímicos.

#### Estructura de la neurona

Morfológicamente las neuronas se caracterizan por tener numerosas prolongaciones (1,2). En la mayoría de las neuronas se distinguen tres regiones celulares bien diferenciadas: el cuerpo celular, las dendritas y el axón. El cuerpo o soma de la neurona suele tener forma esférica o poligonal. En él está localizado el núcleo celular y los sistemas biosintéticos destinados al mantenimiento de la neurona. El núcleo se caracteriza por tener la cromatina laxa, lo que indica una activa transcripción genética. Como consecuencia de ello, en el citoplasma del cuerpo celular existe una considerable cantidad de gránulos de Nissl que, como en otras células, están compuestos por ribosomas y retículo endoplásmico cuya función es la traducción de la información genética, es decir,

la biosíntesis de proteínas (2). Otra característica del citoplasma de la neurona es la de poseer un aparato de Golgi muy desarrollado (2).

Las dendritas son expansiones del cuerpo celular que se ramifican rápidamente en forma arborescente alrededor del soma. Por las dendritas la neurona recibe generalmente las señales de entrada (aférentes). El número de dendritas de una neurona es muy indicativo de su funcionalidad, pues cuanto mayor es la ramificación del árbol dendrítico, la neurona puede recibir mayor número de impulsos de origen diverso (3). Las señales de salida de la neurona (eferentes) son generalmente emitidas a lo largo del axón. El axón, como las dendritas, también se extiende a partir del cuerpo celular, pero a diferencia de éstas, no se ramifica hasta que llega a la célula con la cual se relaciona. En este punto da origen al telodendrón. El axón suele ser de mayor longitud que las dendritas y constituye la vía por la que las señales pueden viajar largas distancias a otras partes del sistema nervioso. Además el axón suele estar rodeado por una o varias capas de mielina. En este caso se dice que el axón está mielinizado y forma la fibra nerviosa mielinizada.

La mielina es una membrana arrollada en espiral sobre el axón y es producida por los oligodendrocitos (células gliales del sistema nervioso central) o por las células de Schwann (en el sistema nervioso periférico). La mielina no cubre totalmente al axón, sino que lo hace en forma de segmentos dejando entre ellos regiones desnudas. Estas zonas no cubiertas por la mielina se conocen como nódulos de Ranvier y son más evidentes en las fibras nerviosas

periféricas. En las neuronas no mielinizadas el impulso nervioso es conducido de una forma continua. Por el contrario, en las neuronas mielinizadas la conducción sólo tiene lugar en los nodos de Ranvier, propagándose de una forma saltatoria(2,4). Los axones mielinizados propagan el impulso a mayor velocidad. Por esto se piensa que el principal papel de la mielina es aislar la conducción nerviosa. Si bien esto es cierto, es probable que la mielina también esté implicada en otras funciones porque recientemente se han localizado en esta membrana diversas actividades enzimáticas (5).

La región más importante de la neurona desde el punto de vista funcional es la sinapsis o unión sináptica. Las regiones sinápticas constituyen zonas de contacto funcional entre dos neuronas o entre una neurona y una glándula u órgano efector. A nivel de la sinapsis se producen la transmisión de impulsos excitatorios o inhibitorios en una sola dirección. Los estudios de Cajal (6) con el microscopio óptico, revelaron una considerable variación en la forma tamaño y distribución de los terminales nerviosos en las diferentes regiones del sistema nervioso central. Las sinapsis se clasifican en : axosomáticas, axodendríticas o axoaxónicas, según los elementos de la neurona que participan en su formación (7). Al microscopio óptico las terminales presentan diversas formas: de botón, de clava, cáliz etc. (6). No obstante, los detalles estructurales de la sinapsis sólo pudieron conocerse mediante el microscopio electrónico. De esta forma, en la unión sináptica pudieron visualizarse las membranas de las dos neuronas separadas por la hendidura sináptica. En la sinapsis las membranas de las dos

neuronas parecen ser más gruesas y densas; y la hendidura puede presentar una serie de filamentos intersinápticos que unen ambas membranas. En la célula postsináptica se observa un sistema de filamentos delgados que penetran a distancias variables y que se denomina retículo subsináptico (8). Así mismo, se observaron densidades presinápticas constituídas por proteínas que tienen abundantes aminoácidos básicos (9,10). De gran importancia fue la demostración de que en las terminales presinápticas existe un componente vesicular, las vesículas sinápticas, que contienen el neurotransmisor (11). Con el microscopio electrónico también fueron descritas, además de las anteriormente mencionadas, otros tipos de uniones sinápticas (12) como las dendrodendríticas; las recíprocas, en las cuales una misma prolongación neuronal puede ser presináptica en un punto y postsináptica en otro; y las sinápsis seriadas, en las que un terminal nervioso puede actuar sinápticamente sobre otro terminal (13).

#### Bioquímica de la neurona.

Bioquímicamente las neuronas se caracterizan por poseer la maquinaria biosintética para los diversos neurotransmisores, por tener sistemas de transporte intracelulares específicos y por poseer una membrana celular excitable.

Actualmente se conocen unas 30 sustancias químicas que tienen o pueden tener una función transmisora (14), es decir, que al ser liberadas por el terminal de una neurona pueden interaccionar con otra neurona u órgano efector provocando una respuesta. De las diversas sustancias transmisoras las neuronas suelen liberar solo una (Regla de Dale) aunque existe la posibilidad de que haya neuro

nas que liberen más de un neurotransmisor (15). Las neuronas productoras de un mismo transmisor no se distribuyen al azar sino que se localizan en grupos específicos que envían sus axones a regiones determinadas del sistema nervioso.

La síntesis del transmisor comprende una o varias reacciones enzimáticas. Estas enzimas son producidas en el cuerpo celular puesto que en el terminal nervioso no hay retículo endoplásmico ni ribosomas. Como los axones son fibras muy delgadas que pueden alcanzar una longitud de varios milímetros y hasta centímetros, la neurona necesita un sistema muy activo de transporte desde el cuerpo celular al terminal nervioso (16-18) para llevar hasta allí el neurotransmisor o bien las enzimas necesarias para su síntesis. Además en los terminales nerviosos sólo tiene lugar un 2% de la síntesis de las proteínas que son rápidamente renovadas (19,20). Estas proteínas tienen una vida media comprendida entre 12 horas y 100 días (21), y para ser reemplazadas es necesario que nuevas proteínas alcancen el terminal nervioso. Se han demostrado dos tipos de transporte en dirección ortógrada (del cuerpo al terminal) para las proteínas: un flujo axonal rápido y un flujo axonal lento (22).

El flujo axonal rápido alcanza una velocidad de alrededor de 280 mm por día. Es utilizado para el transporte de proteínas que son sintetizadas en el retículo endoplásmico. Las proteínas son transportadas primero al complejo de Golgi, y luego pasan al axón y a las dendritas, principalmente por medio de los túbulos y vesículas del retículo endoplásmico liso. Las proteínas transportadas por este flujo rápido están destinadas a recambiar las proteínas de las membranas (23) y pueden ser recuperadas en las frac-

ciones particuladas (24). Prácticamente todas las glicoproteínas son transportadas por el flujo rápido (25).

El flujo axonal lento alcanza una velocidad de 1 a 1.5 mm por día; es utilizado para transportar proteínas solubles y, en menor extensión, algunas proteínas mitocondriales (26). Estas proteínas son sintetizadas por polisomas libres y, probablemente, no pasan por el complejo de Golgi. Por este flujo se transportan proteínas solubles tales como la colina acetiltransferasa, la actina y la tubulina, cuyo recambio en el axón es muy lento.

Los flujos axonales rápido y lento se utilizan para compensar la pérdida de proteínas locales que tienen lugar por proteólisis, o por liberación en el terminal nervioso. Para estos flujos son necesarios los microtúbulos, puesto que son interrumpidos por drogas que los destruyen (27,28).

Aparte de estos flujos ortógrados, existen también flujos retrógrados, es decir, desde el terminal nervioso al cuerpo celular (29). Se sabe que existe un flujo retrógrado inespecífico que tiene lugar cuando en los terminales se colocan macromoléculas a elevada concentración. Así, por ejemplo, si en los terminales se coloca peroxidasa de rábano o seroalbúmina a elevada concentración, estas macromoléculas aparecen más tarde en el cuerpo celular (29-31). También existe un transporte retrógrado específico que depende de la unión de la molécula que va a ser transportada a sitios específicos de la membrana del terminal nervioso (32). Un ejemplo de transporte específico retrógrado es el del factor nervioso de crecimiento, que es una proteína de bajo peso molecular indispensable para el crecimiento de las neuronas noradrenérgicas (33) y que

estimula algunas enzimas implicadas en el metabolismo de la adrenalina como la tirosina hidroxilasa y la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (34). Una vez que el factor de crecimiento nervioso es captado por el terminal se transporta a lo largo del axón y se concentra en el soma de la neurona (35). Además del factor de crecimiento nervioso, son transportadas por el flujo retrógrado específico otras macromoléculas como las lectinas y ciertas toxinas. Pero las toxinas no quedan confinadas al soma celular, sino que también pasan a los terminales presinápticos y de allí, a otras neuronas (36). Este sistema de transporte transináptico es importante desde un punto de vista patológico, puesto que, de esta forma, es como ciertos virus y toxinas pueden llegar al sistema nervioso central sin atravesar las barreras sangre-cerebro, y son muchas las enfermedades nerviosas que tienen un origen infeccioso (37).

#### La membrana neuronal

Otra especialización bioquímica de la neurona consiste en poseer una membrana externa capaz de conducir el impulso nervioso. Se ha comprobado que la maquinaria molecular involucrada en la conducción de este impulso está localizada en la membrana del axón. Esto fue demostrado en el axón gigante del calamar, en el cual, el axoplasma puede ser sustituido por diversas disoluciones de electrolitos; la propagación de los potenciales de acción puede producirse en estas preparaciones, en las que se ha eliminado la mayor parte del citoplasma y sólo queda la membrana (38). Por otra parte, en el terminal, la membrana interviene en la liberación de los neurotransmisores y en la región postsináptica contiene receptores que responden a los transmisores. La membrana interviene además,

en el reconocimiento de otras células durante el desarrollo embrionario de forma que cada neurona encuentra su propio lugar y establece sus conexiones precisas en la complicada red del tejido nervioso (39). Por estas razones, gran parte de la neurobiología actual está centrada en el estudio de las membranas del sistema nervioso.

La membrana de la neurona, como la membrana externa de todas las células, está constituida fundamentalmente por lípidos, carbohidratos y proteínas (40). Estos componentes pueden estar libres o asociados entre sí, dando lugar a glucolípidos, glucoproteínas, lipoproteínas y glucolipoproteínas (41). Una propiedad general de los componentes de la membrana es que poseen una zona hidrofóbica y otra polar. Así ocurre por ejemplo, con los fosfolípidos, glucolípidos y con ciertas proteínas. Este carácter anfipático da lugar a que sus componentes se encuentren asociados entre sí de tal forma, que las regiones hidrófobas están fuera del contacto del agua relacionadas por interacciones hidrofóbicas, mientras que, los grupos polares se encuentran dirigidos hacia la interfase acuosa. Por lo tanto, las interacciones hidrofóbicas son muy importantes en el mantenimiento de la matriz de la membrana. Estas fuerzas dan lugar a estructuras que no son rígidas, puesto que se originan más bien por la repulsión del agua de las zonas apolares, que por la atracción entre estas regiones (42). De esta forma, las membranas son estructuras casi fluidas en las cuales, los movimientos de los componentes moleculares están solamente restringidos dentro del conjunto de la capa que constituye la membrana. Una evidencia de este tipo de estructura fluida es el hecho de que la mayoría de las mem

branas celulares se pueden dispersar fácilmente por acción de disolventes orgánicos, detergentes o agentes disociantes (43).

La relación lípido-proteína varía mucho de una membrana a otra: en general, las proteínas suelen constituir más del 50% del contenido de la membrana (44). Una excepción es la mielina que contiene alrededor de un 20% de proteínas (45), por lo que en esta membrana, las proteínas no son suficientes para cubrir a los lípidos como ocurre en la mayoría de los casos.

Los componentes lipídicos más importantes de la membrana son los fosfolípidos, el colesterol y los galactolípidos, cuya proporción es diferente en las distintas membranas. Los fosfolípidos mayoritarios de la membrana son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la esfingomielina, que no tienen carga neta a pH fisiológico. Estos lípidos pueden empaquetarse fuertemente por medio de interacciones hidrofóbicas, dado que no presentan repulsión eléctrica. Además de estos lípidos neutros, la mayoría de las membranas contienen de un 5 a un 20% de lípidos ácidos, constituídos fundamentalmente por fosfatidilserina, fosfatidilinositol, cardiolipina, fosfatidilglicerol y sulfolípidos. Los lípidos ácidos tienen carga neta a pH fisiológico y tienden a separar el empaquetamiento por fuerzas hidrofóbicas, salvo que sus cargas sean neutralizadas por cationes. Cuando se tratan las membranas con fosfolipasa C (enzima que hidroliza el enlace éster fosfoglicérido) sólo el 70% de los fosfoglicéridos se convierten en glicéridos neutros (46,47). Los restantes fosfoglicéridos no tienen su grupo fosfato accesible a la enzima, probablemente, porque se encuentran interaccionando con restos positivos, en su mayoría de proteínas (48). Los fosfolípidos mejor

predispuestos a este tipo de interacción son los acídicos, puesto que sus grupos negativos pueden unirse a los restos aminoácídicos básicos. Otro tipo de interacción electrostática es la unión de los lípidos aniónicos a los residuos negativos de las proteínas por medio de puentes con cationes divalentes (49,50). Estas interacciones iónicas tienden a compactar la membrana, mientras que las interacciones hidrofóbicas que se dan entre los fosfolípidos neutros y el colesterol, la fluidifican (51).

Las proteínas de membrana han sido divididas en "proteínas extrínsecas o periféricas" y en "proteínas intrínsecas o integrales" de acuerdo a la forma con que pueden ser extraídas (43).

Las proteínas periféricas pueden separarse de las membranas por procedimientos relativamente suaves, como la sonicación, la adición de sustancias quelantes o el aumento de la fuerza iónica; y cuando son solubilizadas, no suelen llevar lípidos unidos. Estas propiedades indican que las proteínas periféricas no están unidas fuertemente a los lípidos, y que su unión al resto de la membrana, está mantenida por interacciones iónicas. Ejemplos de ellas son el citocromo C, que puede ser disociado de la mitocondria con disoluciones de concentradas de sal (52,53); la espectrina, que puede separarse del eritrocito mediante agentes quelantes (54); y la acetilcolinesterasa, que puede extraerse con altas concentraciones de  $\text{ClNa}$  (55-57).

Por el contrario, las proteínas intrínsecas o integrales, requieren procedimientos de extracción más drásticos, como el empleo de disolventes orgánicos o detergentes. Frecuentemente llevan lípidos asociados cuando se aislan, y tienen mucha tendencia a for

mar agregados que precipitan. Probablemente, los agregados se forman por interacción entre las superficies hidrófobas de las proteínas. En algunos casos, se forman agregados de tamaño limitado que son solubles en agua (58,59), pero lo más común es que se necesiten detergentes para mantener las proteínas intrínsecas solubles en agua. El estudio de las proteínas integrales de diferentes membranas ha demostrado que son muy heterogéneas en relación al peso molecular (60,61), y que frecuentemente, están unidas a oligosacáridos formando glicoproteínas (62,63). Entre las proteínas intrínsecas se encuentran la mayoría de las enzimas unidas a las membranas como la adenilciclase (64,65), algunas guanilciclasas (66,67) o las diversas ATPasas (68-70); los antígenos de histocompatibilidad (71), y los receptores de drogas y hormonas (72); y los proteolípidos, que son proteínas muy hidrofóbicas, cuya extracción puede hacerse mediante disolventes orgánicos. Después de ser aislados de la sustancia blanca de cerebro (73), los proteolípidos fueron aislados de diversas membranas (74,75). Algunos de ellos pueden presentar propiedades de receptores (76) o ionóforos (77).

Podría esperarse que las proteínas intrínsecas contuvieran un reducido número de aminoácidos polares en comparación con las proteínas solubles en medio acuoso. En vista de esto, Capaldi y Vanderkooi (78) analizaron la composición de aminoácidos de un número amplio de proteínas. Pudieron comprobar que la mayoría de las proteínas hidrofóbicas contenían aproximadamente de un 30 a un 40% de aminoácidos polares, pero, en algunas, este porcentaje era próximo al 50%. Este bajo contenido de restos polares puede ser parcialmente causante de la hidrofobicidad de las proteínas intrínsecas.

No obstante, para explicar su alta hidrofobicidad, parece necesario pensar que las proteínas adoptan una conformación tal que en la superficie se encuentran los restos hidrófobos y en el núcleo los restos polares. Es decir, tienen una conformación inversa a la que adoptan las proteínas hidrosolubles. Esta conformación tendrá un potencial químico alto en medios acuosos (42), de ahí su difícil extracción de las membranas.

Una de las principales características de la organización molecular de las membranas es la asimetría de todos sus componentes químicos (79), es decir, los lípidos, carbohidratos y proteínas están distribuidos de forma distinta en la superficie interna y externa de la membrana.

De esta forma, se ha podido demostrar, mediante el uso de reactivos no penetrantes (80) que la distribución de los fosfolípidos es altamente asimétrica. Se supone que esta asimetría es bastante estable y que hay poco intercambio de lípidos entre las dos superficies (80,81). La distribución de los oligosacáridos es también muy asimétrica. Tanto los glucolípidos como las glucoproteínas se encuentran confinados exclusivamente en la superficie externa de la membrana (82,83). Esta distribución asimétrica de lípidos y carbohidratos da lugar a que la superficie externa de la membrana esté cargada negativamente.

Las proteínas de la membrana también están distribuidas asimétricamente. Algunas evidencias de tal asimetría proceden de experimentos en los que se somete a digestión proteolítica las membranas en posición normal e invertida (80,85).

Las diversas propiedades de las membranas biológicas han da

do origen a distintos modelos moleculares de membrana. Inicialmente, Danielli y Davson en 1935 (86) postularon un modelo en el que se suponía la membrana constituida por una bicapa lipídica a la que las proteínas se adhieren en ambas interfases lípido-agua, disminuyendo, de esta forma, la tensión superficial de la bicapa. Este modelo explicaba la permeabilidad celular a las sustancias liposolubles y la baja tensión superficial que presenta la membrana celular. Las observaciones al microscopio electrónico dieron lugar al modelo trilaminar, también llamado de unidad de membrana, que fue elaborado por Robertson (87). Este modelo interpreta las imágenes al microscopio electrónico considerando la membrana como una estructura lipoproteica, en la que las regiones hidrofóbicas de los lípidos constituyen la zona interior (de baja densidad electrónica), mientras que las cabezas polares de los lípidos están en las láminas exteriores (electrónicamente densas) interaccionando con las proteínas. Las proteínas adoptarían preferentemente una conformación  $\beta$  para poder extenderse sobre la bicapa lipídica. Posteriormente, pudo comprobarse que las proteínas de membrana están predominantemente en conformación de  $\alpha$ -hélice (88,89). Por otra parte, el modelo de Robertson es termodinámicamente inestable, debido a que en él, los restos no polares de los aminoácidos están expuestos al agua, mientras que los grupos iónicos y polares de los lípidos son separados del contacto con el agua por las capas proteicas.

Para superar esta dificultad termodinámica e integrar todos los datos químicos y físicos que se tenían sobre la membrana biológica, Singer y Nicolson postularon en 1972 el modelo de "mosaico

fluido de membrana" (40). Este modelo postula: 1) que los lípidos están en forma de bicapa, 2) las proteínas integrales están incluidas en esta bicapa con una disposición en forma de mosaico, mientras que las periféricas se encuentran adheridas a la superficie de la bicapa, 3) las membranas son estructuras casi fluidas en las cuales los lípidos y las proteínas integrales pueden tener movimientos de translación en el plano de la membrana. La fluidez de la membrana es consecuencia de que sus principales componentes están mantenidos por fuerzas no covalentes (90).

Disposiciones proteicas similares habían sido propuestas por Wallach y Zahler en 1966 (91) y por Vanderkooi y Green en 1970 (92). El modelo de mosaico fluido es el más aceptado actualmente. Una modificación reciente consiste en la inclusión de micelas invertidas de lípidos en el interior de la bicapa (93). Esta modificación está basada en los resultados obtenidos mediante la aplicación de la resonancia magnética nuclear (94,95) y la criofractura a los liposomas y a las membranas biológicas.

La disposición proteica del modelo de mosaico fluido se estudió mediante la criofractura de membranas. Cuando la criofractura tiene lugar en el plano de la membrana, se observa al microscopio electrónico una matriz lisa interrumpida por numerosas partículas de unos 85 Å de diámetro. Mediante esta técnica, se ha podido observar que las diversas membranas pueden tener de un 12 a un 80% de su superficie cubierta por proteínas (98-101). Una excepción interesante es la mielina, en la que no se observan partículas por criofractura. Ello puede deberse a que esta membrana tiene un contenido alto de lípidos. Por otra parte, mediante técnicas

de fijación que no extraen proteínas durante la preparación de las muestras, se obtiene una apariencia granular de la membrana, tanto por microscopía electrónica convencional como por criofractura (102). De acuerdo con estos resultados, se piensa que la imagen de la unidad de membrana es, en gran parte, un artificio de técnica.

La fluidez de la membrana fue demostrada por experimentos de fusión celular como el de Frye y Eidin (103). Estos investigadores siguieron la distribución de proteínas en células de ratón y humanas fusionadas con virus Sendai. Marcaron los respectivos antígenos con marcadores de fluorescencia de diferente color y observaron que, a los cuarenta minutos de la fusión celular, los componentes antigénicos estaban muy entremezclados. También se ha demostrado la fluidez de la membrana biológica fusionando células en las que la adenilciclase estaba inactivada, pero con el receptor  $\beta$ -adrenérgico intacto, con otras células que sólo contenían la enzima. Cuando se produce la fusión celular, tiene lugar el acoplamiento de la enzima con el receptor (104). Mediante técnicas físicas como la difracción de Rayos X o la resonancia magnética nuclear, se puede demostrar también la fluidez de la membrana (105). Estas técnicas suministran información sobre el empaquetamiento lípido-proteína y sobre la velocidad de rotación de las moléculas a través de la bicapa (106,107).

La fluidez de la membrana se debe a que está mantenida principalmente por fuerzas hidrofóbicas, las cuales son poco intensas. Esta fluidez permite a la célula deformarse y resellarse si su superficie se rompe por alguna parte. Tales propiedades de

la célula, no serían posibles si las membranas estuvieran mantenidas por otras fuerzas más intensas, dado que éstas producen estructuras rígidas y menos flexibles.

#### Los receptores de membrana:Neurorreceptores

Lo que hace una membrana celular diferente de otra son sus proteínas (108). De hecho, parece ser que la comunicación controlada a través de las membranas sólo puede realizarse de forma eficaz por medio de las proteínas (42). Las proteínas de la membrana de cualquier célula, según su función, se agrupan en cinco clases: enzimas, bombas, canales, receptores y proteínas estructurales.(108). Estas cinco clases de proteínas no se excluyen entre sí. Por ejemplo una misma proteína podría ser receptor y proteína estructural, es decir, puede realizar varias funciones.

Dada la importancia de las membranas en la función de la neurona y la transcendencia que tienen las proteínas en la membrana, es lógico pensar que las proteínas de la membrana neuronal desempeñan un papel clave en la función nerviosa (108). Por este motivo, centramos la presente tesis en uno de los diversos tipos de proteínas de la membrana: los receptores.

El concepto de receptor fue elaborado por Langley en 1905, al definir la "sustancia receptiva" de la unión microneural, como el sitio de acción de la nicotina y el curare, y como el sitio por el que compiten ambas drogas (109). Desde entonces, durante décadas, la idea de receptor fue un concepto operacional indispensable para entender la forma de acción de los fármacos (110). Sólo recientemente, han podido estudiarse bioquímicamente los receptores gracias al desarrollo de técnicas de unión específica de ligandos radioactivos

(111,112). Los receptores deben ser considerados como entidades estructurales definidas. Esto se deduce de las propiedades químicas específicas que requiere un ligando para interaccionar con un receptor (110). Por ejemplo, los isómeros ópticos de un mismo compuesto generalmente difieren en su capacidad para unirse a un receptor, lo que hace suponer una complementaridad estructural entre un ligando y su receptor específico.

Gracias al empleo de ligandos radioactivos, se ha podido demostrar que el efecto farmacológico que tienen muchas drogas y neurotoxinas, se debe a su capacidad para bloquear activar o modificar determinados neurorreceptores. También se sabe que ciertas enfermedades mentales, como la corea de Huntington (113) o la enfermedad de Parkinson (114), y ciertas enfermedades motoras como la miastenia gravis (115), pueden tener como causa alteraciones en los neurorreceptores.

Para un mismo tipo de transmisor puede haber distintos tipos de neurorreceptores que difieren tanto en su función, como en sus propiedades de unión de ligandos. Así por ejemplo, hay receptores nicotínicos y muscarínicos para la acetilcolina (116), receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos (117,118) etc. y también receptores pre- y postsinápticos para diversos neurotransmisores.

#### Localización de los neurorreceptores; Receptores pre- y postsinápticos

La funcionalidad de un receptor depende, en gran medida, de su localización en la célula. Uno de los problemas actuales en las investigaciones sobre neurorreceptores en el sistema nervioso central es el de su localización con respecto a la región sináptica. Me-

dante el fraccionamiento subcelular, pudieron ser aisladas las terminaciones nerviosas (119) y, posteriormente, se demostró que en ellas se presentaba la mayor capacidad de unión de neurotransmisores (110). Esto demostraba que los neurorreceptores están concentrados en la región sináptica.

La localización de los neurorreceptores en la región sináptica está de acuerdo con la teoría química de la transmisión del impulso nervioso. según esta teoría, el transmisor es almacenado en las terminales nerviosas en forma de vesículas (121). Cuando el impulso nervioso alcanza el terminal, el neurotransmisor es liberado a la hendidura sináptica, donde interacciona, de forma específica, con el receptor situado en la membrana postsináptica. Esta interacción da lugar a un cambio conformacional reversible del receptor, el cual desencadena una serie de procesos en la membrana postsináptica, dando lugar a la translocación de iones (lo que produce un cambio de potencial en la membrana), al desplazamiento de calcio y a la activación de ciertas enzimas como la adenilciclase y las implicadas en el recambio del fosfatidilinositol (122). Todos estos procesos dan lugar a una ampliación de la señal eléctrica (123).

En los últimos años ha habido profundos cambios en las ideas acerca de la localización de los receptores con respecto a la región sináptica. Pues, además de estos receptores postsinápticos, un número cada vez mayor de evidencias experimentales sugieren la existencia de receptores localizados en los terminales nerviosos (124, (125). Estos neurorreceptores están relacionados con la regulación de la liberación del neurotransmisor, adecuándola a las diferentes condiciones. Esta regulación implica una acción del neurotransmi-

sor liberado sobre el mismo sitio de liberación, lo que representa un tipo de autorregulación (126). El efecto del neurotransmisor puede ser excitatorio o inhibitorio, dando lugar a una retroalimentación positiva o negativa (126).

Probablemente, el primer experimento que sugirió la existencia de receptores presinápticos, fue el de Brown y Gillespie (127). Estos investigadores observaron que la presencia de fenoxibenzamina (un antagonista  $\alpha$ -adrenérgico) aumentaba enormemente el flujo de noradrenalina a partir del bazo de gato cuando se estimulaba el nervio esplénico. Este efecto estaba relacionado, de alguna forma, con el bloqueo de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Inicialmente se pensó, que la droga antagonista bloqueaba el receptor postsináptico, lo que permitía la salida al flujo sanguíneo del receptor liberado. Posteriormente se sugirió la posibilidad de que la fenoxibenzamina impidiera la recaptura de noradrenalina en los terminales nerviosos.

Pero la primera evidencia de la localización presináptica de neurorreceptores, procede del trabajo de Paton y Vizi de 1969 (128), quienes demostraron que la fenoxibenzamina suprimía el efecto inhibitorio de la noradrenalina sobre la liberación de acetilcolina del ileo de cobaya en reposo, o bajo estimulación. Esto implicaba que la noradrenalina inhibía presinápticamente la liberación de acetilcolina. A este ejemplo de inhibición presináptica  $\alpha$ -adrenérgica de liberación de acetilcolina, siguió la demostración de una inhibición similar de la liberación de noradrenalina, presentada simultáneamente por diversos laboratorios (124,129,130). Desde entonces, durante los últimos diez años, han aparecido numerosos trabajos en los que se demuestra la localización presináptica de di

versos neuroreceptores (124,125).

El mecanismo mediante el cual los receptores presinápticos inhiben la liberación del neurotransmisor no está completamente aclarado. Ciertas observaciones sugieren que la activación de los receptores presinápticos  $\alpha$ -adrenérgicos limita la disponibilidad de calcio necesaria para que continúe la liberación del neurotransmisor. De esta forma, una baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular potencia el efecto inhibitorio de la clonidina, sobre la liberación de noradrenalina, durante la estimulación nerviosa del conducto deferente de cobaya; por el contrario, las concentraciones extracelulares altas de  $\text{Ca}^{2+}$ , anulan la inhibición producida por la clonidina (131). Lo mismo parece ocurrir en la inhibición producida por las prostaglandinas en la estimulación nerviosa del conducto deferente (126). Sin embargo, en la inhibición de la liberación de acetilcolina en la electroblaca de Torpedo, no parece estar implicada la recaptura del  $\text{Ca}^{2+}$  por el terminal, sino más bien la fosforilación de proteínas (132); puesto que la activación del receptor presináptico inhibe la fosforilación de proteínas, sin inhibir la captura de  $\text{Ca}^{2+}$ . También existe evidencia de un mecanismo presináptico de generación de GMPcíclico, implicado en la regulación de liberación de noradrenalina en la glándula pineal (133).

La mayor parte de las investigaciones sobre receptores presinápticos han sido realizadas en las terminales adrenérgicas del sistema periférico. La existencia de receptores presinápticos  $\alpha$ -adrenérgicos en este sistema está apoyada por las siguientes observaciones: 1) La regulación de la liberación de noradrenalina es independiente de la naturaleza  $\alpha$  o  $\beta$  de los receptores postsinápticos

que median la respuesta del órgano efector (134-136). 2) La regulación de la liberación de noradrenalina no está afectada por la atrofia de la célula efectora postsináptica (135,137), lo cual implica que la regulación se debe al terminal mismo y no al órgano efector. 3) Hay reducción en el número de sitios de unión  $\alpha$ -adrenérgicos en las membranas del ventrículo de corazón después de la destrucción de los terminales adrenérgicos aferentes (138).

A parte de los receptores presinápticos  $\alpha$ -adrenérgicos del sistema nervioso periférico, se tiene evidencia de otros receptores presinápticos, tanto en el sistema nervioso periférico, como en el central. Así por ejemplo, diversas observaciones sugieren la presencia de receptores presinápticos  $\alpha$ -adrenérgicos en el sistema nervioso central (139-142).

Los mecanismos de retroalimentación negativa de acetilcolina pueden corresponder a la presencia de receptores presinápticos muscarínicos inhibitorios, tanto en el sistema nervioso periférico (143), como en el central (144,145). También han sido descritos receptores muscarínicos presinápticos en la electroplaca del Torpedo (132). La existencia de receptores nicotínicos presinápticos no ha podido ser demostrada en los ganglios simpáticos (146), pero sí en la unión neuromuscular (147,148), donde pueden regular la liberación de acetilcolina (147).

Los receptores presinápticos de dopamina parecen estar implicados en los mecanismos de retroalimentación negativa de liberación de dopamina, en el estriado de rata (149,150) y en el caudado de conejo (151). Pero al mismo tiempo, estos receptores pueden estar implicados en el control de la biosíntesis de dopamina a nivel de la

tirosina hidroxilasa (152). También existen evidencias de receptores presinápticos GABAérgicos (153,154) y opiáceos (155,156) en el sistema nervioso central.

La presencia de receptores presinápticos en el sistema nervioso central ha sido sugerida al demostrarse que la liberación de neurotransmisores de los cortes cerebrales sometidos a despolarización, podía ser inhibida por varias sustancias que actúan de forma específica sobre los distintos neurorreceptores. Estas pueden actuar sobre el mismo terminal, pero también pueden actuar sobre estructuras vecinas (como células gliales o el terminal postsináptico) que pueden emitir una segunda señal sobre el terminal nervioso. Otra posibilidad es actúen sobre interneuronas cortas que se proyectan sobre estos terminales(142).

Esta última posibilidad ha sido eliminada mediante experimentos en los que se demuestra que los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos inhiben la liberación de noradrenalina en las preparaciones de sinaptosomas (157). Sin embargo, las otras alternativas subsisten porque los sinaptosomas tienen la membrana postsináptica unida, y además, los sinaptosomas noradrenérgicos se encuentran en las preparaciones rodeados de terminales no noradrenérgicos. Por tanto, subsiste la posibilidad de que el sitio primario de acción de las drogas moduladoras sea la membrana postsináptica o las estructuras vecinas. Por otra parte, los resultados de la modulación dopaminérgica obtenidos en sinaptosomas, están en contradicción con los obtenidos en cortes cerebrales (158,159).

El uso de ligandos radioactivos para marcar los neurorreceptores, junto con las lesiones selectivas de las vías nerviosas,

ofrece otra alternativa para detectar los receptores presinápticos. Mediante este procedimiento pudo demostrarse que había una reducción del 22% en los receptores GABAérgicos del cuerpo estriado, donde el GABA facilita la liberación de dopamina (160,161), cuando se destruy<sub>er</sub>ían las vías dopaminérgicas nigroestriatales (162), y lo mismo sucede con los receptores opiáceos (163). También se ha demostrado que la destrucción de las neuronas noradrenérgicas centrales reduce el número de receptores opiáceos en la corteza cerebral y cerebelosa (164), y de receptores muscarínicos en el estriado y en la región mesolímbica (165).

Pero los resultados obtenidos por lesiones de vías nerviosas han sido negativos en aquellos casos en que el transmisor inhibe su propia liberación mediante receptores presinápticos. De esta forma, aunque las drogas muscarínicas inhiben la liberación de acetilcolina en el hipocampo (166), cuando se destruye las vías colinérgicas que van del septo al hipocampo, no se observa reducción en el número de receptores muscarínicos del hipocampo (167). De la misma manera, las lesiones de los tractos dopaminérgicos nigro-estriatales, no reduce el número de sitios dopaminérgicos del cuerpo estriado (168). En el caso del receptor  $\alpha$ -adrenérgico, la destrucción de las neuronas noradrenérgicas produce un ligero aumento del número de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en las regiones innervadas (169,170). Sin embargo, estos datos negativos no demuestran la ausencia de receptores presinápticos, puesto que estos receptores podrían ser cuantitativamente minoritarios a pesar de su importante función. Por otra parte, los métodos en los que se utilizan las lesiones tienen el inconveniente de que una reducción substancial de los receptores

presinápticos puede quedar contrarrestada por un aumento en los sitios postsinápticos a causa de la supersensibilidad (aumento de receptores) producida por la denervación (171).

Enfoque bioquímico para el estudio de receptores pre- y postsinápticos - Objetivos y hallazgos

Con el fin de obtener una demostración más directa de la localización pre- y postsináptica de receptores centrales, desarrollamos una metodología basada en los estudios anteriores de De Robertis y col. (120). En la misma se aprovecha la solubilización selectiva de la membrana presináptica producida por el tratamiento suave con detergente. Cuando los sinaptosomas aislados de cerebro se someten a un choque osmótico, se obtienen las membranas sinaptosomales (119) (Fig. 1). Si se tratan estas membranas con Triton X-100 0.1-0.2%, se disuelve la mayor parte de la membrana presináptica quedando intacta la membrana postsináptica (Fig. 1). Esto pudo demostrarse mediante la microscopía electrónica de las fracciones de membranas antes y después de la acción del detergente (172). Después de este tratamiento, la unión de agentes nicotínicos como la ( $^{14}\text{C}$ )-dimetil-d-tubocurarina ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC y el ( $^{14}\text{C}$ )-dimetil hexametonio, se concentró en las membranas postsinápticas (120). Sin embargo, ciertas actividades enzimáticas unidas a las membranas, como la ATPasa ( $\text{Na}^+; \text{K}^+$ ) y la acetilcolinesterasa, se redujeron considerablemente, sugiriendo que tienen una localización preferentemente presináptica.

En nuestro trabajo hemos utilizado la ( $^3\text{H}$ )-dihidroergocriptina ( $^3\text{H}$ )-DHE), la ( $^3\text{H}$ )-naloxona y el ( $^3\text{H}$ )-bencilato de quinuclidina ( $^3\text{H}$ )-QNB) para marcar respectivamente los receptores  $\alpha$ -adrenérgi-

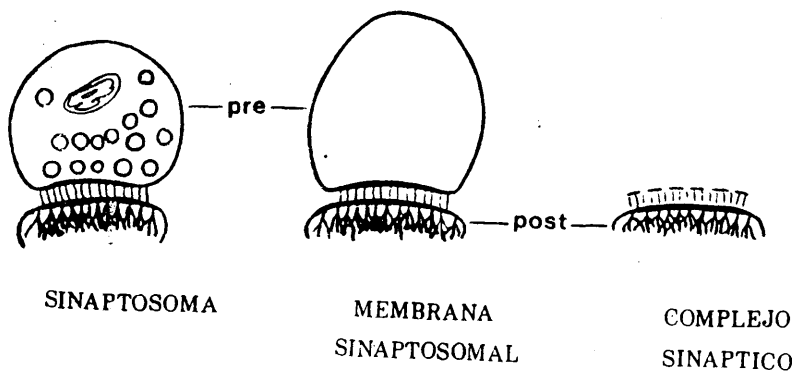


Figura 1.- Diagrama basado en las observaciones con el microscopio electrónico. En él se muestra los sinaptosomas aislados, la membrana sinaptosomal (obtenida después del choque osmótico) y el complejo sináptico (obtenido después del tratamiento con Triton X-100 0.1-0.2%). También se indica la probable localización de los receptores pre- y postsinápticos

cos, opiáceos y muscarínicos en las membranas sinaptosomales aisladas, y determinar la localización de estos receptores en la sinapsis. Durante el curso de estos trabajos hemos llevado a cabo una serie de estudios sobre la unión de estas drogas a las membranas. Al estudiar la acción de los detergentes sobre la unión, encontramos que, dependiendo de la concentración, pueden aumentar o disminuir la unión de las drogas a los receptores, pero todos ellos tienen una acción inhibitoria a concentraciones que pueden disolver la membrana presináptica. Sin embargo, una vez formado el complejo droga-receptor, éste es estable a la acción de los detergentes. Por este motivo, llevamos a cabo la disolución de la membrana presináptica después de la unión de las drogas radioactivas a las membranas.

Mediante este procedimiento, se demostró que la unión específica de ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC por unidad de masa de proteínas aumentaba al disolverse la membrana presináptica, lo que confirma la unión preferentemente postsináptica de esta droga. Por el contrario, la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE, ( $^3\text{H}$ )-naloxona y ( $^3\text{H}$ )-QNB se reducían por este tratamiento. Estos resultados pueden interpretarse suponiendo la presencia de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y muscarínicos tanto en la pre como en la postsinápsis, mientras que los receptores nicotínicos tienen una localización fundamentalmente postsináptica.

El hecho de que el complejo ligando-receptor fuera estable a la acción del detergente nos hizo pensar en la posibilidad de proteger el receptor mediante la unión de un ligando específico. La protección mediante ligandos ha sido muy empleada en farmacología clásica para diferenciar cada uno de los distintos receptores que

se encuentran en un tejido (173,174). De esta forma, la atropina se usó para proteger el receptor muscarínico del intestino de la acción de la dibenamina, con lo que se bloquearon todos los receptores de este tejido menos los muscarínicos (175,176).

Para proteger el receptor muscarínico de las membranas sinaptosomales de la acción desnaturizante del Triton X-100, utilizamos una estrategia similar, y encontramos que la acción del detergente podía ser contrarrestada mediante la protección del receptor con atropina. La protección producida por otras drogas colinérgicas fue menos efectiva. Al mismo tiempo, se observó que la acción del detergente podía ser reversible o irreversible dependiendo de su concentración.

Por otra parte, los efectos que producen los detergentes sobre los neuroreceptores nos llevaron a estudiar la acción de otras drogas relacionadas con ellos y que tienen importancia terapéutica: los anestésicos locales. Como anestésico local se define una droga que, al ser aplicada directamente sobre un músculo o célula nerviosa, produce un bloqueo reversible del potencial de acción. En este sentido, una gran variedad de compuestos liposolubles como las aminas anestésicas, tranquilizantes, anticonvulsivantes, detergentes etc., que pueden abolir el potencial de acción de la membrana excitable actuando principalmente sobre la conducción del sodio, se dice que tienen acción anestésica (177).

Así como los detergentes producen efecto anestésico, los anestésicos tienen una acción tipo detergente, dado que aumentan la fluidez o desorden tanto en las membranas modelo (178,179), como en las biológicas (180,181). De esta forma, los anestésicos alteran

las interacciones lípido-proteína en diversas membranas (181), lo que modifica las propiedades cinéticas de las enzimas de membrana (182,183). Por otra parte, encontramos que el efecto de los detergentes sobre los neuroreceptores es similar al que tienen los anestésicos.

La acción de los anestésicos ha sido estudiada en los sistemas colinérgicos nicotínicos de la electroplaca y la unión mioneuronal (184-187). También se ha demostrado que los anestésicos locales pueden inhibir en el sistema nervioso central los receptores nicotínicos (188), los opiáceos (189,190), los  $\alpha$ -adrenérgicos (191) y los muscarínicos (191); así como los muscarínicos de músculo cardíaco (192) y de las neuronas en cultivo (193). En los receptores nicotínicos, parece ser que los anestésicos actúan sobre el ionóforo asociado al receptor (187,194), pero en los otros receptores el mecanismo de acción es menos conocido.

Uno de los problemas sobre la inhibición producida en los receptores muscarínicos por los anestésicos era si éstos interactúan directa o indirectamente con el sitio receptor (191,193). Para aclarar este problema, estudiamos el efecto de los anestésicos locales procaína, tetracaína y dibucaína, así como el de las drogas adrenérgicas propranolol y fentolamina (que también tienen acción anestésica) sobre los receptores muscarínicos de las membranas sinaptosomales. Comprobamos que todas estas drogas a concentraciones micromolares inhiben la unión de ( $^3$ H)-QNB a las membranas sinaptosomales. Las características de esta inhibición varían con la concentración de anestésico pudiendo aparecer como competitiva o no-competitiva, pero en ningún caso se presenta cooperatividad entre la unión de anes

tésicos y de ( $^3\text{H}$ )-QNB. Al mismo tiempo, comprobamos que los anestésicos locales, a diferencia de los ligandos muscarínicos, no protegen al receptor de la acción deleterea del Triton X-100. Estos resultados sugieren que los anestésicos locales no actúan directamente sobre el receptor muscarínico, sino más bien sobre un sitio relacionado con el mismo.

De esta forma, se han estudiado diversos aspectos de los neurorreceptores en el sistema nervioso central como su localización en las membranas sinaptosomales, y la modificación de sus propiedades por diversas drogas que alteran el estado de las membranas.

### III - MATERIALES Y METODOS

En este capítulo se describirán los métodos generales empleados en esta Tesis. Estos métodos comprenden desde la recolección del material y el fraccionamiento subcelular para aislar las membranas sinaptosomales (Fig. 1), hasta el uso de ligandos radioactivos específicos para detectar los diversos receptores pre- y postsinápticos. También se describirán las técnicas utilizadas para la protección del receptor muscarínico, y para estudiar el efecto de anestésicos locales y otras drogas sobre la fijación de ligandos a este receptor (vease Introducción).

#### 1. Fraccionamiento subcelular

Para la separación de las membranas del sinaptosoma se siguió la técnica descrita por De Robertis y col. (119). Todos sus pasos se llevaron a cabo a 4 °C, utilizando disoluciones a las que se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas.

a) De acuerdo al receptor estudiado, se disecó la corteza cerebral o los núcleos basales de cerebro de gato.

##### b) Homogeneización

Se homogeneizó en sacarosa 0.32 M y al 10% (Por ejemplo 10g de tejido en 100 mL). Para la homogeneización se utilizó un Potter de vidrio con vástago de teflón, y la misma se hizo en tres periodos de 1 minuto con uno de intervalo.

##### c) Separación de núcleos

El homogeneizado se centrifugó en un rotor Sorvall SS-34 a 2750 rpm durante 10 minutos. Se decantó y se guardó el sobrenadante. El sedimento, que contiene principalmente los núcleos (fracción

nuclear) se resuspendió en sacarosa 0.32 M al 30% (30 mL de sacarosa por 10 g de tejido original); se rehomogeneizó y centrifugó como anteriormente, guardando el sobrenadante. La fracción nuclear se lavó al 50% en sacarosa y centrifugó nuevamente. Los sedimentos se descartaron y los sobrenadantes se reunieron.

d) Separación de la fracción mitocondrial

Los sobrenadantes reunidos se centrifugaron a 9750 rpm durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se recogieron los sedimentos. Estos se rehomogeneizaron en 20 mL de sacarosa y se repitió la centrifugación descartándose el sobrenadante. El sedimento corresponde a la fracción mitocondrial cruda (Mit) que contiene sinaptosomas, mielina y mitocondrias (119).

e) Choque osmótico de los sinaptosomas

Con el fin de obtener las membranas sinaptosomales, se resuspendió la fracción Mit en 120 mL de agua destilada con PMSF  $10^{-4}$ M por cada 10 g de tejido original, y se homogeneizó durante 1 minuto. Después de 10 minutos a 0° C, se centrifugó a 13000 rpm durante 30 minutos en un rotor Sorvall SS-34.

El sedimento ( $M_1$ ) fue separado y en algunos casos utilizado para los experimentos de fijación de drogas. Esta fracción contiene, además de las membranas sinaptosomales, mielina y mitocondrias.

f) Aislamiento de las membranas sinaptosomales

Con el fin de separar las membranas sinaptosomales de los otros componentes de la fracción  $M_1$ , se prepararon gradientes de 12 mL de sacarosa 1.20M y otros 12 de 0.82M en tubos de rotor Spinco Sw25. Sobre este gradiente se colocaron 5 mL de un homogeneizado de  $M_1$  en sacarosa 0.32 M.

Los gradientes se centrifugaron en el rotor Sw 25 a 25 000 rpm durante 90 minutos. Después de esta centrifugación, la mielina queda sobre la sacarosa 0.82 M, las membranas sinaptosomales sobre la 1.2 M, y las mitocondrias van al fondo del tubo. Con una pipeta Pasteur se saca primero la mielina y luego las membranas sinaptosomales.

Las membranas sinaptosomales separadas del gradiente, se diluyeron 6 veces en agua destilada con PMSF  $10^{-4}$  M y se centrifugaron en un rotor Spinco 30 a 25 000 rpm durante 30 minutos. Los sedimentos que se obtienen se guardaron a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso.

## 2. Microscopía electrónica de las fracciones subcelulares

Se siguió el procedimiento de Mattson y O'Brian (195). Las membranas frescas se lavan con sacarosa 0.32 M y se fijan con glutaraldehído al 6% en tampón cacodilato sódico 0.1M pH=7.4, durante 90 minutos a  $0^{\circ}$  C. El precipitado se lava con sacarosa al 6% en cacodilato sódico 0.1 M, y se fijan con  $OsO_4$  en el mismo disolvente durante 20 minutos

La deshidratación se lleva a cabo a  $0^{\circ}$  C con los siguientes pasos:

1. Etanol al 30% 2 veces 10 minutos
2. " " 50% 30 "
3. " " 70% 30 "
4. " " 70% 12 "
5. " " 90% 30 "
6. " " 100% 30 "

En el paso 4 se realiza el contraste utilizando acetato de

uranilo al 2% en acetona al 70%. Los bloques se pusieron en óxido de propileno con dos cambios durante 10 minutos. Para la inclusión final, los bloques se ponen en epón al 100% y se realiza la polimerización en estufa durante 48 horas a 60° C.

Los bloques se cortaron con un ultramicrotomo Sorvall, y los cortes se tiñieron con acetato de uranilo.

### 3. Determinación de proteínas

Se realizó siguiendo el procedimiento de Lowry y col. (196), modificado para valorar cantidades del orden de los microgramos.

#### a) Reactivos:

A.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1 M

B. Citrato sódico al 1% en  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 M

C. 1 ml de reactivo B mezclado con 50 ml de reactivo A. Debe ser preparado poco antes de su empleo.

D. Reactivo Folin-Ciocalteu (reactivo comercial) diluido con agua hasta dar una concentración de 1N en ácido. Debe prepararse in mediatamente antes de su empleo.

#### b) Método

Mezclar 0.1 ml de muestra con 1 ml de reactivo C. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente. Añadir 0.1 ml de reactivo D, agitar y dejar en ausencia de luz. Después de un intervalo de media a dos horas, la lectura se realiza a 750 nm.

#### c) Curva patrón

La curva patrón se confeccionó con albúmina bovina a las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/ml, haciendo tres determinaciones de cada concentración y tomando el valor promedio.

## d) Modificaciones

Cuando las muestras de proteínas estaban muy diluídas se em-  
pleó hasta 0.3 ml de muestra por ensayo, y las disoluciones patrón  
se llevaron al mismo volumen con agua destilada.

En las determinaciones de proteínas en presencia de detergen-  
tes no-iónicos, el reactivo C se llevó al 3% en SDS para evitar la  
precipitación de estos detergentes.

4. Unión de (<sup>3</sup>H)-DHE a las membranas sinaptosomales

Para estudiar la unión de (<sup>3</sup>H)-DHE a las membranas sinapto-  
somales puras, se siguió el procedimiento que describieron Green-  
berg y Snyder para homogeneizados totales de cerebro (198), intro-  
duciendo algunas modificaciones:

a) Antes de cada ensayo de unión, las membranas sinapto-  
somales se incuban con fosfato de iproniacida 1  $\mu$ M durante 15 minu-  
tos a 25 °C, para inhibir cualquier actividad residual de monoami-  
noxidasa.

b) En cada ensayo se utilizó una cantidad de membranas equi-  
valente a 0.1 mg de proteína resuspendidas en 1 ml de una disolu-  
ción acuosa de pirocatecol 50 mM, ácido ascórbico 0.8%, EDTA 5 mM  
y ditiotreititol 0.5 mM. Luego se pueden agregar también los inhibi-  
dores en un volumen máximo de 10  $\mu$ l.

c) Se incubaba en la oscuridad a 25 °C durante 10 minutos en  
un baño Durnoff con agitación. Se adiciona la (<sup>3</sup>H)-DHE (10-20  $\mu$ l)  
y se continúa la incubación en las mismas condiciones durante 60  
minutos.

d) A fin de detener la reacción, se colocan los tubos en

hielo y se añade 3 ml de tampón frío.

e) Las membranas se filtran a través de filtros GF/C (Whatman) en bajo vacío y se lavan 3 veces con 5 ml de tampón frío que contiene ácido ascórbico 0.1% y pirocatecol 1 mM.

f) Los filtros se colocan en viales, se les añade 6 ml de metilcelosolve al 30% en PPO al 1% en tolueno y se cuentan en un contador de centelleo líquido.

g) La unión específica se determinó como la diferencia de radioactividad entre la unión total a las membranas y experimentos idénticos pero en presencia de (-)norepinefrina 0.1 mM. (199).

##### 5. Unión de (<sup>3</sup>H)-naloxona a las membranas sinaptosomales

Se siguió el procedimiento de Squires y Braestrup (200) con ligeras modificaciones:

a) Se suspenden las membranas sinaptosomales en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 en una proporción de 0.16 mg de proteína por mL de tampón. Para cada ensayo se utiliza 0.5 ml de esta suspensión.

b) Añadir 5 µl de morfina 40 mM a las membranas destinadas para blancos de unión inespecíficas. De esta forma, la concentración final de morfina es 40 µM.

c) Las membranas con o sin morfina se incuban a 37 °C durante 15 minutos en un baño Durnoff con agitación. Agregar la (<sup>3</sup>H)-naloxona en un volumen de 5 a 10 µl, en concentraciones tales que se cubra un rango de concentraciones finales entre 1 y 60 nM, y se vuelve a incubar en las mismas condiciones durante 15 minutos.

d) Se detiene la reacción colocando las muestras en hielo durante 15 minutos.

e) El contenido de cada tubo se filtra a través de filtros Whatman GF/C con bajo vacío y los filtros se lavan 3 veces con 7 ml de tampón de incubación a 0 °C.

f) Los filtros se colocan en viales a los que se añadió 6 ml de metilcelosolve al 30% en PPO al 1% en tolueno y se cuentan en un contador de centelleo líquido.

g) Los ensayos se realizaron por triplicado y se consideró como unión específica, la diferencia de radioactividad entre las muestras incubadas en ausencia de morfina y las muestras incubadas con morfina 40  $\mu$ M. La unión inespecífica fue alrededor de un 30% de la unión total.

#### 6) Unión de ( $^3$ H)-QNB a las membranas sinaptosomales

Se siguió el procedimiento descrito por Yamamura y Snyder para homogeneizados totales de cerebro (201) introduciendo algunas modificaciones:

a) Se suspenden las membranas sinaptosomales en tampón Na/K  $PO_4$  50 mM ( $Na_2HPO_4$  40.5 mM y  $KH_2PO_4$  19.5 mM) pH 7.4 en una proporción de 0.05 mg de proteína por ml de tampón. Por cada ensayo se utilizan 2 ml de esta suspensión.

b) Se agrega 10  $\mu$ l de sulfato de atropina 1 mM a las muestras destinadas para blancos de cuentas inespecíficas. La concentración final del inhibidor es 5  $\mu$ M.

c) Las muestras son incubadas durante 15 minutos a 25 °C en un baño Durnoff con agitación y se agrega la ( $^3$ H)-QNB en un volumen de 5 a 10  $\mu$ l de etanol absoluto a concentraciones tales que se cubra un rango de concentraciones finales entre 0.1 y 2.0 nM. La

incubación se continúa durante 45 minutos en las mismas condiciones.

d) La reacción se detuvo colocando las muestras en hielo y añadiendo 3 ml de tampón frío. El contenido de cada tubo se filtra a través de filtros Whatman GF/B, y el filtro se lava tres veces con 5 ml de tampón frío.

e) Cada filtro se coloca en un vial al que se añade 6 mL de metilcelosolve al 30% en PPO al 1% en tolueno y se cuenta en un contador de centelleo líquido.

f) Los ensayos se realizaron por triplicado y se consideró como unión específica la diferencia de radioactividad entre las muestras incubadas en ausencia de atropina y las incubadas en presencia de atropina.

#### 7. Unión de ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC a las membranas sinaptosomales

Se realiza en las mismas condiciones utilizadas para la ( $^3\text{H}$ )-QNB, pero con una concentración única de ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC ( $=0.5 \mu\text{M}$ ) Como blancos se tomaron muestras preincubadas con DMTC fría a 1 mM de concentración final.

#### 8. Acción de los detergentes sobre la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE, ( $^3\text{H}$ )-naloxona y ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas sinaptosomales

Con el fin de determinar la acción de los detergentes sobre la unión específica de estas drogas se utilizó Triton X-100, Nonidet P-40, dioxicolato y digitonina a concentraciones entre  $10^{-5}$  y  $10^{-1}\%$  (w/v). El ensayo de unión se lleva a cabo con cada droga como se indica anteriormente, pero añadiendo la misma can-

tividad de detergente a las muestras experimentales y a los blancos con inhibidor. La concentración de droga radioactiva fue constante en estos ensayos ( $(^3\text{H})\text{-DHE}=6 \text{ nM}$ ,  $(^3\text{H})\text{-naloxona}=10 \text{ nM}$  ( $(^3\text{H})\text{-QNB}=0.9 \text{ nM}$ ).

#### 9. Aislamiento de los complejos sinápticos

Tal como se mencionó en la Introducción, el tratamiento de las membranas sinaptosomales aisladas con Triton X-100 0.1-0.2% produce la desintegración preferencial de la membrana presináptica aislándose los complejos sinápticos. Dado que las concentraciones de detergente necesarias para separar estos complejos sinápticos inactivan la unión de las distintas drogas (ver resultados), se aplicó el tratamiento con detergente después de marcar las membranas con los distintos ligandos radioactivos:

a) Las membranas sinaptosomales (en una concentración de 0.1 mg de proteína por ml) se sometieron a los distintos ensayos de unión descritos anteriormente pero sin filtración, y utilizando una concentración fija de droga radioactiva ( $(^3\text{H})\text{-DHE}=6 \text{ nM}$ ,  $(^3\text{H})\text{-naloxona}=10 \text{ nM}$  y  $(^3\text{H})\text{-QNB}=1.4 \text{ nM}$ ). Al final del periodo de incubación las membranas se centrifugaron a 100 000xg durante 60 minutos.

b) Los sedimentos se lavaron dos veces superficialmente con agua destilada, se resuspendieron en el tampón de incubación y se centrifugaron de nuevo a 100 000xg durante 1 hora. Este proceso se repitió una vez más para eliminar la radioactividad libre.

c) Después del marcaje de las membranas, los complejos sinápticos se separaron por el procedimiento de Fiszer y De Rober-

tis (172). Las membranas sinaptosomales a una concentración de 2 mg de proteína por ml se trataron durante 10 minutos a 0 °C con Triton X-100 0.1-0.2%, y se centrifugaron a 100 000xg durante 1 hora.

d) En otros experimentos las membranas se sometieron a un tratamiento más drástico con Triton X-100 0.5%,  $\text{NaHCO}_3$  0.5 M, sacarosa 0.32 M en tampón Tris-HCl 6 mM pH 8.1, durante 15 minutos a 0 °C con agitación intermitente. Este tratamiento disuelve las membranas pre- y postsinápticas dejando intactas las densidades postsinápticas (202).

e) Para valorar proteínas y determinar la radioactividad se tomaron alícuotas por triplicado de las membranas no tratadas con Triton X-100 (controles) y de las tratadas con detergente.

f) En todos los casos la unión específica se determinó por diferencia con blancos incubados en presencia de inhibidores específicos a las concentraciones indicadas anteriormente.

#### 10. Experimentos de protección

La protección del receptor muscarínico de la acción desnaturalizante del Triton X-100 se realizó por el siguiente procedimiento:

a) Las membranas sinaptosomales (4 mg de proteína por ml de suspensión) se preincubaron en presencia de sulfato de atropina 2.5 ó 10  $\mu\text{M}$  a 25 °C durante 15 minutos en tampón  $\text{Na/K PO}_4$  50 mM, pH 7.4.

b) Después de esta incubación, la suspensión se enfrió en un baño de hielo y se diluyó al doble con el tampón conteniendo

una concentración de Triton X-100 dos veces superior a la concentración final de detergente que se deseaba. De esta forma, durante el tratamiento con Triton X-100 la suspensión de membranas era de 2 mg de proteína por ml. Se mantiene la suspensión en presencia de detergente durante 10 minutos a 0 °C.

c) Las membranas se centrifugaron a 100 000xg durante 30 minutos. Luego se lavó dos veces la superficie del sedimento con agua destilada, se resuspendió en tampón y se centrifugó de nuevo. Este procedimiento de lavado se repitió una vez más para eliminar el detergente y la atropina.

d) Se llevaron controles de membranas tratadas sólo con atropina o detergente, y de membranas sin ningún tratamiento.

Para proteger el receptor también se emplearon otras drogas colinérgicas. Estos experimentos se realizaron a concentraciones fijas de atropina (=2.5  $\mu$ M) y de Triton X-100 (=0.1%).

Para determinar si los anestésicos protegían los sitios receptores en las membranas sinaptosomales crudas, se siguió el mismo esquema experimental utilizando anestésicos a la concentración 500  $\mu$ M y Triton X-100 a 0.2%.

En todos los casos, la unión de ( $^3$ H)-QNB a las membranas se midió como se indica anteriormente, a la concentración 0.9 nM.

#### 11. Efecto de los anestésicos sobre la unión de ( $^3$ H)-QNB a las membranas sinaptosomales crudas

Para determinar el efecto de estas drogas sobre la unión de ( $^3$ H)-QNB, las membranas sinaptosomales crudas se suspendieron en tampón K/Na PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7.4 a una concentración de proteínas

de 0.1 mg/ml, se adicionaron los anestésicos a la concentración deseada y el ensayo de unión con ( $^3\text{H}$ )-QNB se llevó a cabo como se indicó anteriormente.

#### 12. Productos químicos

Las drogas frías utilizadas en los ensayos de unión fueron: sulfato de atropina (Mann Research Lab. Inc.), ( $\pm$ ) propranolol (Ayest), fenoxibenzamina (Smith, Kline and French), serotonina, dopamina, (-)norepinefrina, dimetil-d-tubocurarina, procaína, tetracína y dibucaína (Sigma). Las drogas radioactivas: ( $^3\text{H}$ )-DHE 21 Ci/mmol) y ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC (94.7 mCi/mmol) de Amersham, ( $^3\text{H}$ )-naloxona (8.23 Ci/mmol) y ( $^3\text{H}$ )-QNB (29.4 Ci/mmol) de New England Nuclear.

Los detergentes utilizados: Triton X-100 y ~~de~~oxicolato sódico (Sigma), digitonina (Biochem) y Nonidet P-40 (BDH Ltd.).

Las demás drogas y reactivos se utilizaron en grado analítico.

#### **IV - RESULTADOS**

En el presente capítulo se describirá de forma ordenada la serie de resultados experimentales sobre los neuroreceptores centrales que constituyen la parte original de la presente Tesis.

Como se mencionó en la Introducción, estos resultados permiten postular la localización pre- y postsináptica de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y colinérgicos muscarínicos centrales, así como la preferente localización postsináptica de los receptores colinérgicos nicotínicos. También se muestran aspectos originales acerca de la acción de los detergentes, los anestésicos locales y otras drogas sobre los receptores, y demuestran que es posible proteger a ciertos receptores mediante ligandos específicos.

#### 1. Características de los receptores $\alpha$ -adrenérgicos centrales

El estudio del receptor  $\alpha$ -adrenérgico central se realizó utilizando el antagonista específico ( $^3\text{H}$ )-DHE que se fija de forma competitiva tanto a receptores pre- como postsinápticos.

La fijación específica a las membranas sinaptosomales de los núcleos basales del gato, en el rango 0.1-6.0 nM de ( $^3\text{H}$ )-DHE, resultó en una curva hiperbólica que satura entre 4y6 nM (Fig.2A).

La representación de Scatchard confirmó la existencia de una sola clase de sitios de unión con una constante de disociación  $K_d=3.7$  nM, y un número máximo de sitios de unión  $B_{\text{max}}=1000$  pmol/g de proteína (Fig.2B) (203). Por otra parte, se demostró que no existe cooperatividad entre los sitios de unión, pues el número de Hill (204) es  $N_H=0.95$  (Fig. 2C), es decir, próximo a la unidad.

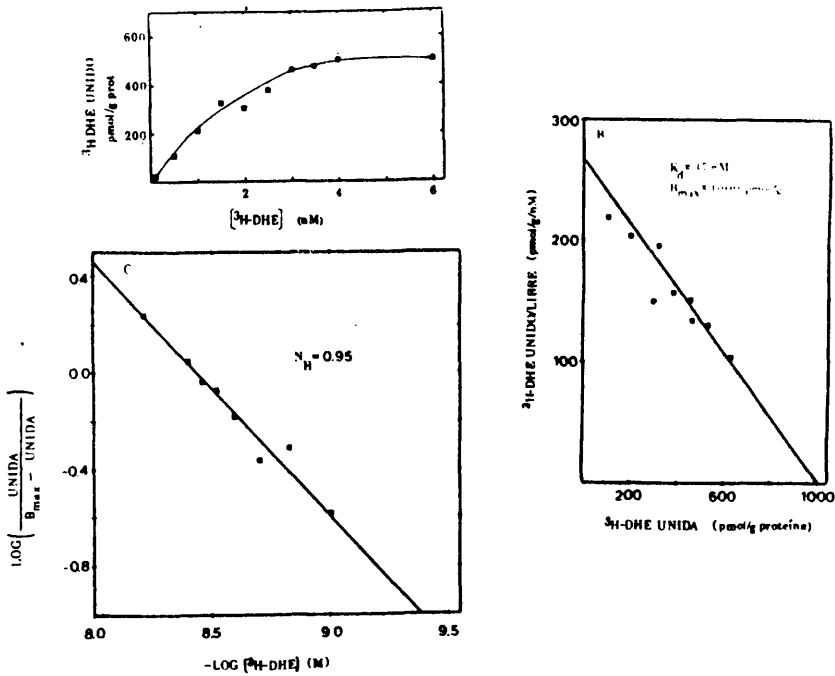


Figura 2.- Unión de la  $(^3\text{H})$ -DHE a las membranas sinaptosomales de los núcleos basales del gato. Las membranas sinaptosomales (0.1 mg de proteína por ml) se incubaron con  $(^3\text{H})$ -DHE 0.1 a 6.0 nM y se filtraron como se indica en Métodos. Sólo se representa la unión específica. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado con una variación menor del 10%; cada punto es el promedio de dos experimentos separados.

A, curva de saturación; B, representación de Scatchard; C, representación de Hill de los mismos experimentos.

Se hicieron experimentos para demostrar la especificidad de la unión de la ( $^3\text{H}$ )-DHE a los  $\alpha$ -adrenorreceptores, tal como se muestra en la Fig. 3 y en la Tabla I. La fenxibenzamina es la droga que desplaza más fuertemente la unión de la ( $^3\text{H}$ )-DHE, seguida de la fentolamina y la (-)norepinefrina (Fig. 3A). Las constantes de inhibición de estas drogas son respectivamente 7, 16 y 787 nM (Tabla I). En la Figura 3B, se muestra el efecto que sobre la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE, tienen otras drogas no- $\alpha$ -adrenérgicas ( $\pm$ )propranolol, serotonina, y dopamina. Estas drogas tienen un efecto pequeño en el desplazamiento de ( $^3\text{H}$ )-DHE, y sus constantes de inhibición son 6 000, 16 000 y 55 000 nM respectivamente. La Tabla I también muestra las  $\text{IC}_{50}$  de todas estas drogas en la inhibición de la unión de la ( $^3\text{H}$ )-DHE.

Estos resultados confirman la especificidad de la unión de la ( $^3\text{H}$ )-DHE a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y demuestran que, en el rango de concentraciones utilizadas, no hay fijación de esta droga a receptores serotoninérgicos y dopaminérgicos.

## 2. Características de los receptores a los opiáceos

El estudio de los receptores a los opiáceos se realizó utilizando el antagonista específico ( $^3\text{H}$ )-naloxona que se fija fuertemente al sitio receptor. La fijación específica a las membranas sinaptosomales de los núcleos basales del gato demostró la existencia de dos sitios que se saturan a diferente concentración (Fig. 4). Hay un sitio de alta afinidad que satura a 8-10 nM y otro de menor afinidad que satura a 32-40 nM de ( $^3\text{H}$ )-naloxona.

El análisis de Scatchard corrobora que hay dos sitios dis-

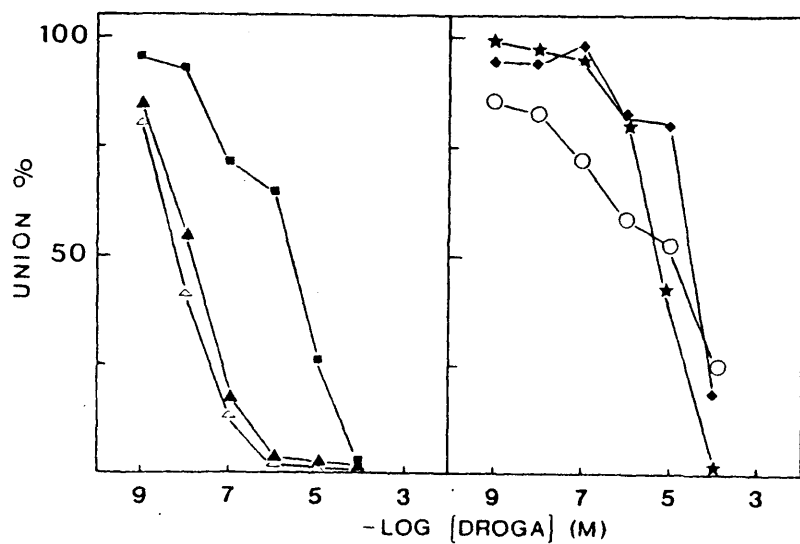


Figura 3.- Inhibición de la unión de  $(^3\text{H})$ -DHE a las membranas sinaptosomales de los núcleos basales del gato por diferentes drogas. La unión de  $(^3\text{H})$ -DHE se realizó a la concentración de 1 nM en presencia de las distintas drogas. Los puntos son las medias de tres experimentos realizados por triplicado con una variación menor del 15%. A, fenoxibenzamina ( $\Delta$ - $\Delta$ ), fentolamina ( $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ ) y (-)norepinefrina ( $\blacksquare$ - $\blacksquare$ ). B, (+)propranolol ( $\star$ - $\star$ ), serotonina ( $\circ$ - $\circ$ ) y dopamina ( $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ ). Se consideró el 100% la diferencia entre la radioactividad obtenida en los controles sin inhibidor y la obtenida en presencia de (-)norepinefrina 0.1 mM.

TABLA I  
 IC<sub>50</sub> Y K<sub>i</sub> DE LAS DISTINTAS DROGAS SOBRE LA UNIÓN DE  
 (<sup>3</sup>H)-DHE A LAS MEMBRANAS SINAPTOSOMALES

Droga	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>i</sub> (nM)
Fenoxibenzamina	9	7
Fentolamina	20	16
(-)Norepinefrina	1 000	789
Dopamina	70 000	55 000
Serotonina	20 000	16 000
(+)Propranolol	7 000	6 000

Las IC<sub>50</sub> se obtuvieron de las curvas de desplazamiento ilustradas en la Fig. 3. La K<sub>i</sub> se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$K_i = IC_{50} + \frac{[(^3H)\text{-DHE}]}{K_d}$$

IC<sub>50</sub>, concentración de droga que desplaza el 50% de la unión específica de (<sup>3</sup>H)-DHE, K<sub>d</sub>, constante de disociación de la droga radioactiva calculada mediante la representación de Scatchard (Fig. 2), [(<sup>3</sup>H)-DHE] = 1 nM.

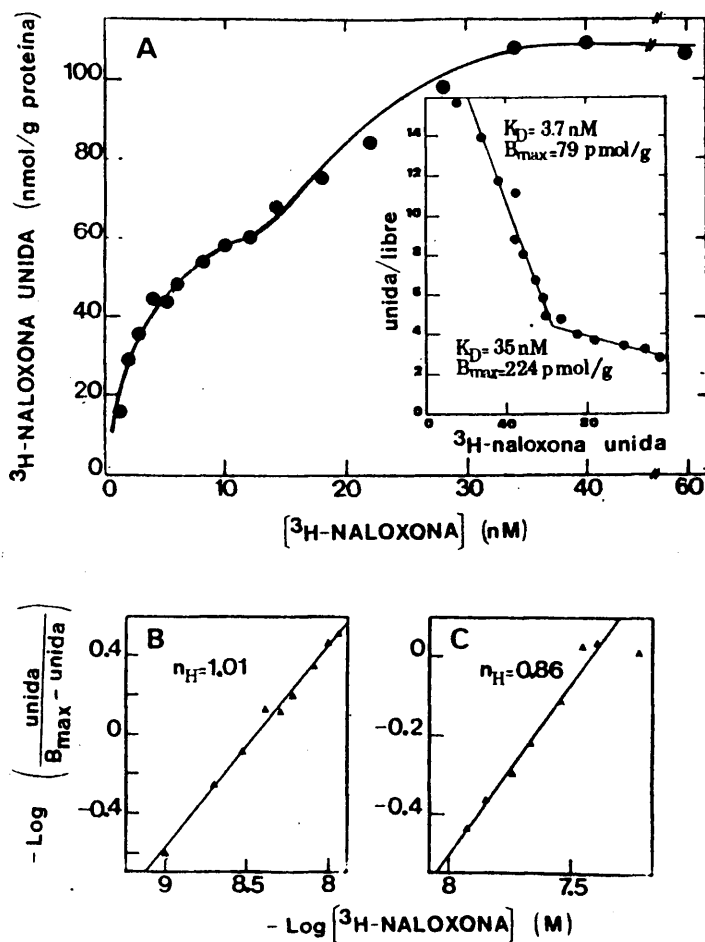


Figura 4.- Unión de ( $^3\text{H}$ )-naloxona a las membranas sinaptosomales de los ganglios basales del gato. Los ensayos de unión se realizaron como se indica en Métodos. A, curva de saturación de la unión específica entre 1 y 60 nM de ( $^3\text{H}$ )-naloxona. La curva muestra tendencia a saturar a dos niveles. En el interior, la representación de Scatchard muestra la  $K_D$  y la  $B_{\text{max}}$  para los sitios de alta y baja afinidad. B, representación de Hill de los sitios de alta afinidad con  $N_H = 1.01$ , C, representación de Hill de los sitios de baja afinidad con  $N_H = 0.86$ . Cada punto de la curva representa el promedio de dos experimentos realizados por triplicado con una variación menor del 10%.

tintos de unión de ( $^3\text{H}$ )-naloxona a las membranas. El sitio de alta afinidad tiene una constante de disociación  $K_{d1}=3.7$  nM y una  $B_{\text{máx1}}=79$  pmol/g de proteína (Fig. 4A interior). La representación de Hill de los sitios de alta afinidad da un número de Hill igual a 1.01 (Fig. 4B), lo que sugiere que no hay cooperatividad entre los sitios de alta afinidad. Los sitios de baja afinidad dieron  $K_{d2}=35$  nM y  $B_{\text{máx2}}=224$  pmoles/g de proteína (Fig. 4A interior). El coeficiente de Hill  $N_H=0.86$ , también sugiere ausencia de cooperatividad en los sitios de baja afinidad (Fig. 4C).

### 3. Características de los receptores colinérgicos muscarínicos

Para el estudio de los receptores muscarínicos centrales se utilizó el antagonista específico ( $^3\text{H}$ )-QNB. La unión de la ( $^3\text{H}$ )-QNB se midió en un rango de droga radioactiva libre entre 0.1 y 2.0 nM (Fig. 5). La curva de saturación es hiperbólica y la meseta se alcanza entre 0.8 y 1.0 nM de droga radioactiva libre (Fig. 5A). La representación de Scatchard indica un único tipo de sitios de unión con  $K_d=0.34$  nM y  $B_{\text{máx}}=2.2$  nmol/g de proteína (Fig. 5B). El número de Hill es  $N_H=1.01$ , lo que confirma que hay un sólo tipo de sitios de unión que además son independientes (Fig. 5C).

Con la fracción de membranas sinaptosomales crudas  $M_1$  (vea se Métodos), se obtuvo una constante de disociación  $K_d=0.25$  nM (Fig. 6C), es decir, ligeramente más baja que la obtenida con las membranas más purificadas. Esta variación puede deberse a la distinta concentración de receptor empleada, puesto que la  $K_d$  calcu-

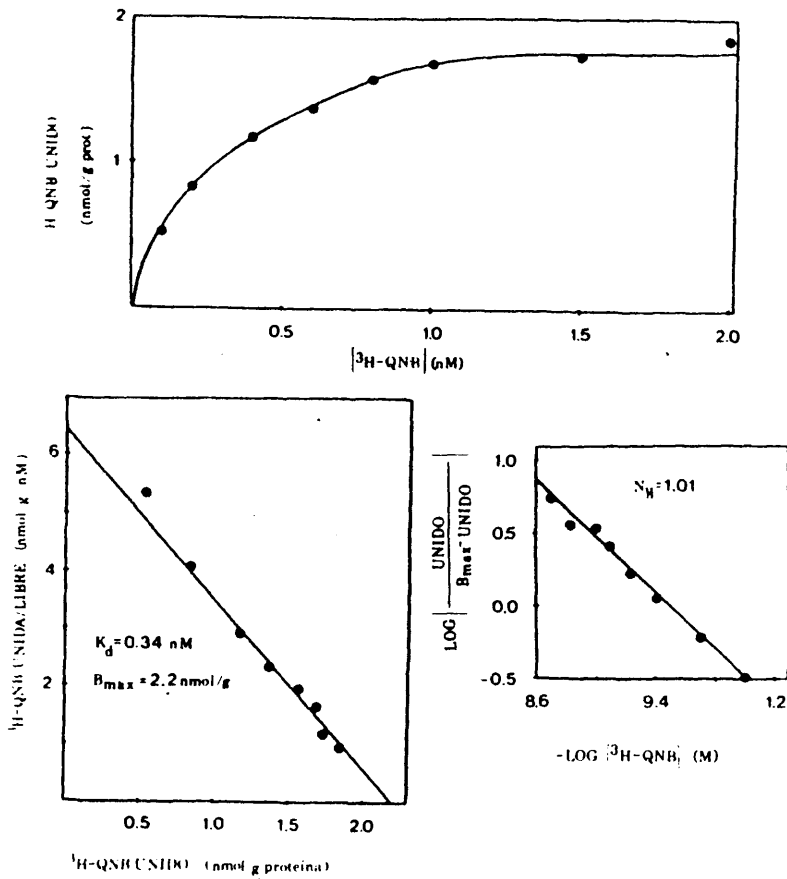


Figura 5.- Unión de la  $(^3\text{H})\text{-QNB}$  a las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de gato. Las membranas sinaptosomales (0.05 mg por ml) se incubaron con  $(^3\text{H})\text{-QNB}$  entre 0.1 y 2.0 nM y se filtraron como se indica en Métodos. Los ensayos se realizaron por triplicado y solamente se representa la unión específica. Los puntos son el promedio de dos experimentos independientes con una variación menor del 5%.

A, curva de saturación, B, representación de Scatchard y C, representación de Hill de los mismos experimentos.

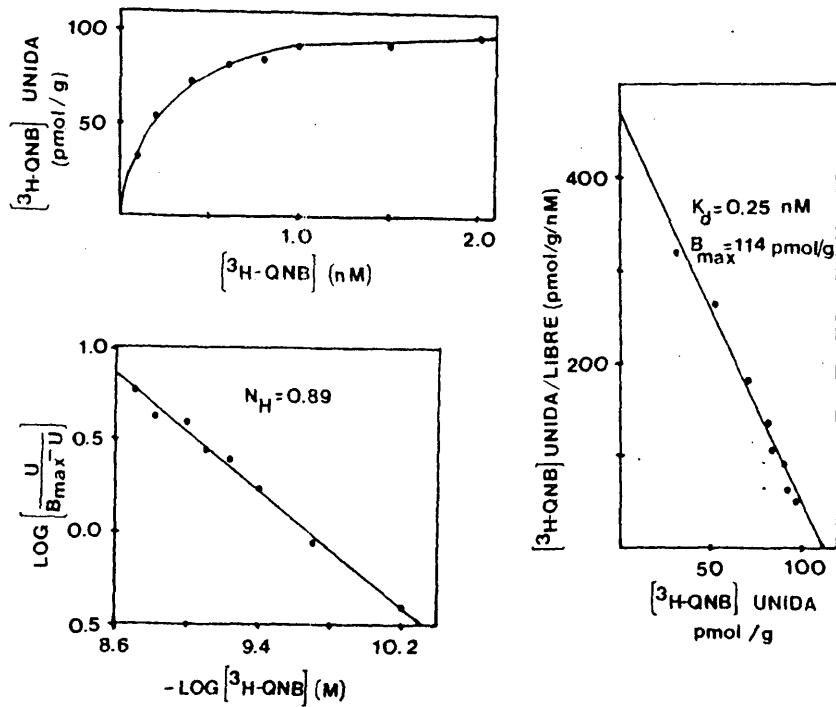


Figura 6.- Unión de la  $(^3\text{H})\text{-QNB}$  a las membranas sinaptosomales crudas de la corteza cerebral de gato. Las membranas sinaptosomales crudas (0.1 mg por ml) se incubaron con  $(^3\text{H})\text{-QNB}$  entre 0.1 y 2.0 nM y se filtraron como se indica en Métodos. Cada punto es el promedio de dos experimentos separados realizados por triplicado con una variación menor del 5%. Sólomente se representa la unión específica.

A, curva de saturación, B, representación de Hill, C, representación de Scatchard de los mismos experimentos.

lada por la representación de Scatchard puede variar con la concentración de receptor (205). Sin embargo, en las membranas crudas la  $B_{\max}$  (=114 pmol/g de proteína) es mucho más baja que en las más puras, lo que indica una menor concentración del receptor. Como en el caso anterior, el número de Hill es próximo a la unidad  $N_H=0.89$ .

#### 4. Efecto de los detergentes sobre los receptores centrales

La acción de diversos detergentes se estudió especialmente en los casos de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y opiáceos. Antes de determinar el efecto sobre la unión de ligandos específicos, se analizó la extracción de proteínas de las membranas sinaptosomales producida por el Triton X-100 y otros detergentes.

En la Tabla II se muestra la solubilización producida por el Triton X-100 0.1 y 0.2% a 0 °C durante 10 minutos, que son las condiciones empleadas para disolver selectivamente la membrana presináptica. En estas condiciones los porcentajes de solubilización de proteínas son respectivamente de un 25 y un 32% con respecto a los controles sin tratar con detergente. Empleando Triton X-100 0.5%, para disolver también la membrana postsináptica, la solubilización es del 45%. Por el contrario, el detergente a la concentración de 0.01% no produce solubilización significativa de proteína, como previamente demostraron Fiszer y De Robertis (172).

Así mismo, puede verse en la Tabla III que tanto el Triton X-100, como otros detergentes a la concentración de 0.01% no

TABLA II

CONTENIDO PROTEICO EN LAS MEMBRANAS SINAPTOSOMALES  
DESPUES DEL TRATAMIENTO CON TRITON X-100 A 0 °C

---

<u>Concentración de Triton X-100 %</u>	<u>Proteínas no solubilizadas %</u>
0.01	100 ± 8 .
0.10	75 ± 5
0.20	68 ± 5
0.50	55 ± 6 .

---

Las membranas sinaptosomales (2 mg de proteínas por mL) se incubaron con las distintas concentraciones de Triton X-100 a 0 °C durante 10 minutos, se centrifugaron a 100 000xg y se lavaron como se indica en Métodos. Las proteínas se determinaron en el sedimento residual por el procedimiento de Lowry (196). El 100% representa la cantidad de proteínas recuperadas en las membranas sometidas al mismo tratamiento en ausencia de Triton X - 100. Los valores son los promedios de seis experimentos separados realizados por triplicado.

TABLA III

CONTENIDO PROTEICO EN LAS MEMBRANAS SINAPTOSOMALES  
DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DETERGENTE A 25 °C

<u>Detergente</u>	<u>Proteínas no solubilizadas %</u>
Triton X-100	97 ± 2
Nonidet P-40	94 ± 2
Desoxicolato	98 ± 1
Digitonina	101 ± 5

Las membranas sinaptosomales (0.1 mg de proteínas por ml) se incubaron con los distintos detergentes a la concentración de 0.01%, a 25 °C durante 60 minutos, se centrifugaron a 100 000xg y se lavaron como se indica en Métodos. Las proteínas se determinaron en el sedimento residual por el procedimiento de Lowry (196). El 100% representa la cantidad de proteínas recuperada en las membranas sometidas al mismo tratamiento en ausencia de detergente.

no producen solubilización significativa de proteínas cuando las membranas se incuban a 25 °C durante 60 minutos. Estos resultados sugieren que la presencia de detergentes a concentraciones menores de 0.01% durante los ensayos de unión de ligandos, no produce una solubilización significativa de receptores de las membranas.

Como se muestra en la Fig. 7, el Triton X-100 produce una inhibición considerable de la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE a las membranas, aun a concentraciones muy bajas. Tanto el Triton X-100 como el Nonidet P-40 a concentraciones de  $10^{-2}\%$  producen una inhibición completa de la unión específica. Como se dijo anteriormente, a estas concentraciones de detergente no se produce solubilización de proteínas de la membrana (Tabla III).

También puede observarse en la Fig. 7 que el Nonidet P-40, el deoxicolato y la digitonina, a concentraciones bajas, producen una estimulación de la unión específica de ( $^3\text{H}$ )-DHE. Con deoxicolato  $10^{-4}\%$ , la unión específica aumenta un 135% con respecto a los controles, y con la digitonina a la misma concentración, el aumento es de un 80%. A concentraciones más altas, tanto el deoxicolato como la digitonina inhiben la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE; pero el efecto no es tan marcado como en el caso del Triton X-100 y del Nonidet P-40. De hecho, con digitonina  $10^{-2}\%$  todavía hay un 60% de unión específica con respecto al control, y con deoxicolato  $10^{-2}\%$  queda un 50%. En presencia de digitonina  $10^{-1}\%$ , hay todavía un 20% de unión específica, pero a esta concentración parte de la unión puede haberse perdido por solubilización del receptor.

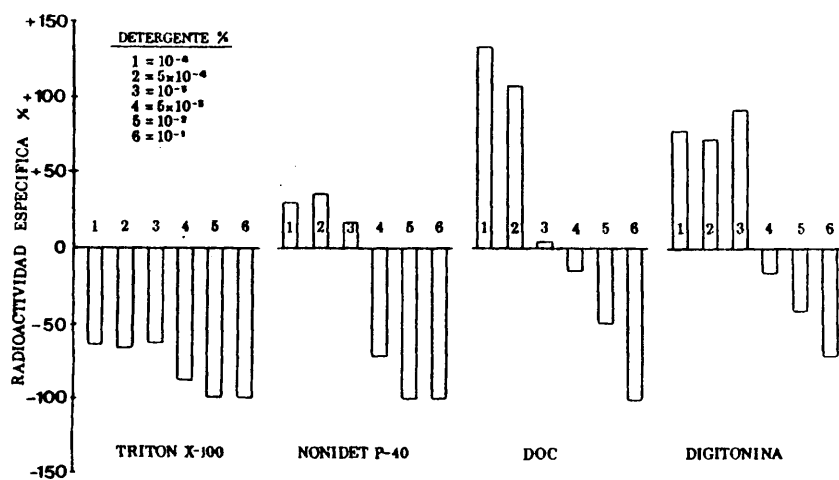


Figura 7.- Efecto de los detergentes sobre la unión de  $(^3\text{H})$ -DHE a las membranas sinaptosomales. La unión a las membranas (0.1 mg de proteínas por ml) se realizó con  $(^3\text{H})$ -DHE 6 nM como se indica en Métodos. Antes del ensayo de unión, las membranas se incubaron a 25 °C durante 10 minutos con los detergentes a las concentraciones indicadas. La línea 0 representa la radioactividad específica de los controles sin detergente (632 pmol/g de proteínas), los valores positivos significan activación y los negativos, inhibición. Los histogramas representan los promedios de dos experimentos independientes realizados por triplicado, con una variación menor del 15%.

Los mismos detergentes a concentraciones entre  $10^{-5}$  y  $10^{-1}\%$  producen un cambio significativo en la unión específica de ( $^3\text{H}$ )-naloxona a las membranas sinaptosomales (Fig. 8). La digitonina y el Triton X-100 tienen un efecto inhibitorio a cualquier concentración. En contraste, el deoxicolato y el Nonidet P-40 producen un incremento de la unión específica de alrededor del 50% sobre el control a la concentración crítica de  $10^{-4}\%$ . Por encima y por debajo de esta concentración, no hay estimulación de la unión específica, y a concentraciones más altas de  $10^{-3}\%$  inhiben marcadamente la unión. En presencia de detergente  $10^{-1}\%$  se observa solamente entre un 5 y un 20% de unión específica, pero a esta concentración parte de la unión puede haberse perdido por solubilización del receptor.

El efecto del Triton X-100 a distintas concentraciones sobre la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB se muestra en la Fig. 9. Puede observarse que en presencia de Triton X-100  $5 \times 10^{-4}\%$  hay ya una inhibición significativa de la unión específica. A la concentración de  $10^{-2}\%$ , la inhibición de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB es casi del 100%. Recordemos que a esta concentración de Triton X-100 todavía no hay solubilización de proteínas de la membrana, tanto cuando el tratamiento se lleva a cabo a 0 °C, como a 25 °C (Tablas II y III).

Debe hacerse notar que en todos estos experimentos el detergente se halla presente durante la incubación de las membranas con droga radioactiva.

##### 5. Estabilidad del complejo ligando-receptor aislado

Una vez analizado el efecto de los detergentes sobre los

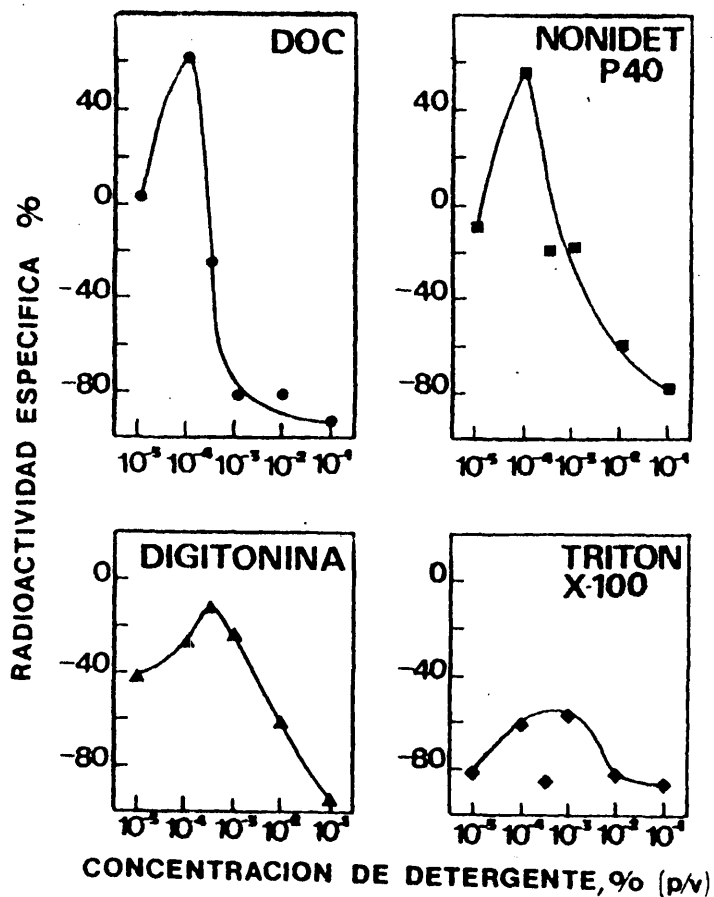


Figura 8.- Efecto de los detergentes sobre la unión de (<sup>3</sup>H)-naloxona a las membranas sinaptosomales. Los ensayos de unión se realizaron como se indica en Métodos utilizando (<sup>3</sup>H)-naloxona 10 nM, en presencia de los distintos detergentes a las concentraciones indicadas. El 0% equivale al control en ausencia de detergente (57 pmol/g de proteínas). Los valores experimentales están expresados como porcentajes por encima (estimulación) o por debajo (inhibición) del control. Los puntos son el promedio de dos experimentos separados realizados por triplicado, con una variación máxima del 10%.

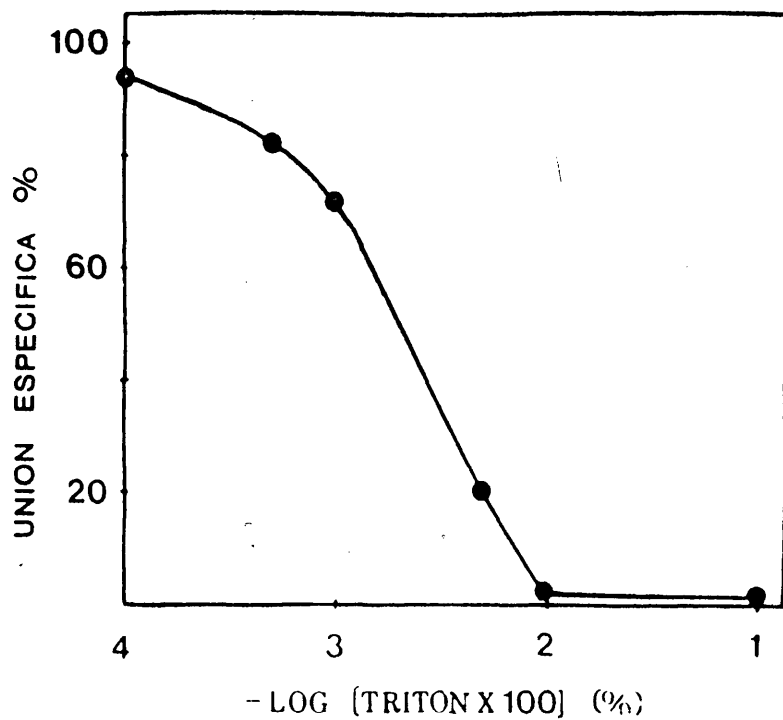


Figura 9.- Efecto del Triton X-100 sobre la unión de ( $^3\text{H}$ ) -QNB a las membranas sinaptosomales. La unión a las membranas (0.05 mg de proteínas por ml) se realizó con ( $^3\text{H}$ )-QNB 0.9 nM como se indica en Métodos, en presencia de las concentraciones indicadas de detergente. El 100% representa la radioactividad específica de los controles en ausencia de detergente (1.73 pmol/g de proteínas). Los puntos son las medias de dos determinaciones independientes realizadas por triplicado con una variación menor del 10%.

distintos receptores, se estudió el grado de estabilidad del complejo droga-receptor aislado de la membrana; dado que, para el estudio de la localización pre- y postsináptica de estos receptores, era de fundamental importancia que formaran complejos muy estables con sus respectivos ligandos específicos (véase más adelante).

Después de realizar el marcaje de las membranas sinaptosomales con ( $^3\text{H}$ )-DHE por la técnica de centrifugación descrita en Métodos, las membranas fueron sometidas al tratamiento con Triton X-100 0.5% a 0 °C. La suspensión de membranas en detergente se dializó contra 100 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.7. Como puede observarse en la Fig. 10, hay una considerable retención de la radioactividad dentro de la bolsa de diálisis tanto en las membranas sometidas al tratamiento con detergente, como en otras no sometidas a este tratamiento. Por ejemplo, 1 hora después de comenzar la diálisis no hay pérdida significativa de radioactividad ni en las membranas tratadas ni en las controles. Sin embargo, en los blancos de droga libre, dializados en las mismas condiciones y con la misma cantidad inicial de radioactividad, hay una reducción de un 67% en la radioactividad al cabo de 1 hora de diálisis. Estos resultados sugieren que después de unirse la ( $^3\text{H}$ )-DHE a las membranas, el complejo droga-receptor que se forma es bastante estable a la acción del Triton X-100.

También pudo demostrarse la estabilidad del complejo ( $^3\text{H}$ )naloxona-receptor. Tanto las membranas marcadas intactas, como las que se sometieron al tratamiento con Triton X-100 después

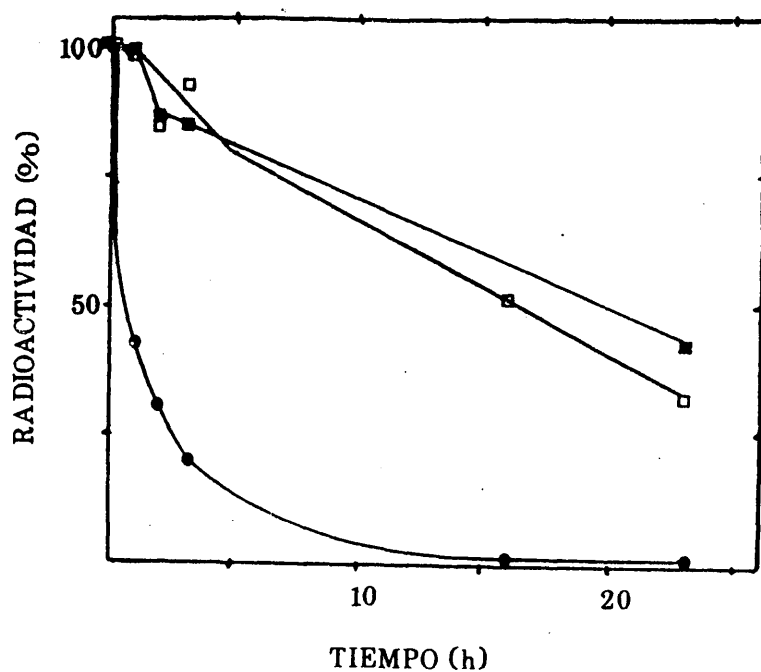


Figura 10.- Diálisis de las membranas sinaptosomales marcadas con (<sup>3</sup>H)-DHE y tratadas con Triton X-100 0.5%. Las membranas sinaptosomales se marcaron con (<sup>3</sup>H)-DHE 6 nM y la radioactividad libre se eliminó por centrifugación. Los sedimentos se resuspendieron y trataron con Triton X-100 0.5% (ver Métodos). La suspensión de membranas en detergente se dializó contra 100 volúmenes de tampón de incubación. Membranas control sin detergente (□-□); membranas tratadas con Triton X-100 (■-■); (<sup>3</sup>H)-DHE libre (●-●).

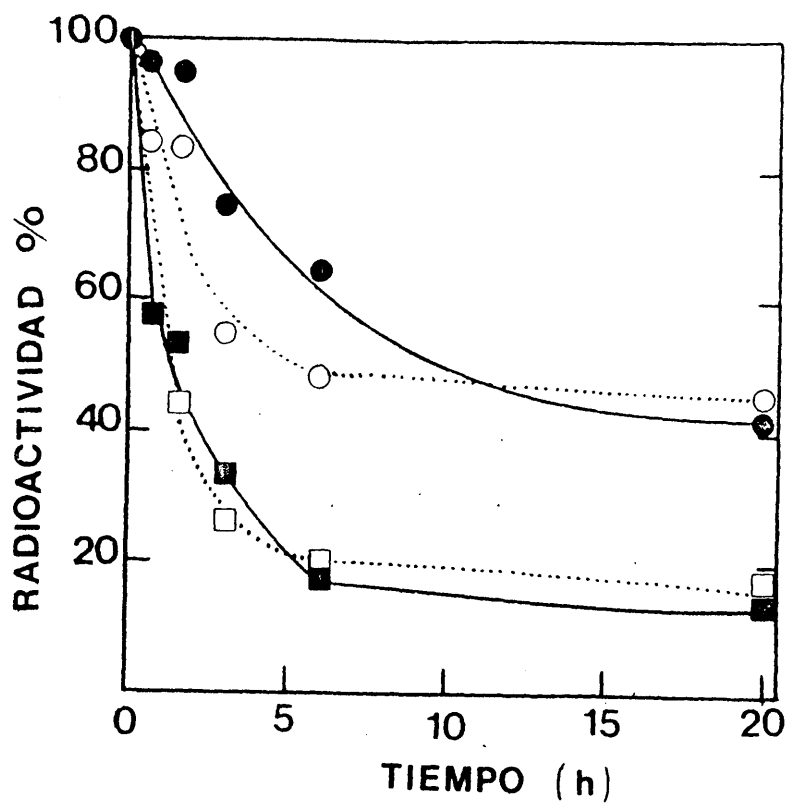


Figura 11.- Diálisis de las membranas sinaptosomales marcadas con ( $^3\text{H}$ )-naloxona en presencia de Triton X-100 0.5% (●-●) o en ausencia de detergente (○-○). Las membranas se marcaron con ( $^3\text{H}$ )-naloxona 10 nM y la radioactividad libre se eliminó por centrifugación. El 100% representa la radioactividad en el tiempo 0 de diálisis. Experimentos similares se realizaron con ( $^3\text{H}$ )-naloxona libre en presencia (■-■) o ausencia de Triton X-100 0.5% (□-□). Cada punto es el promedio de dos experimentos separados realizados por triplicado

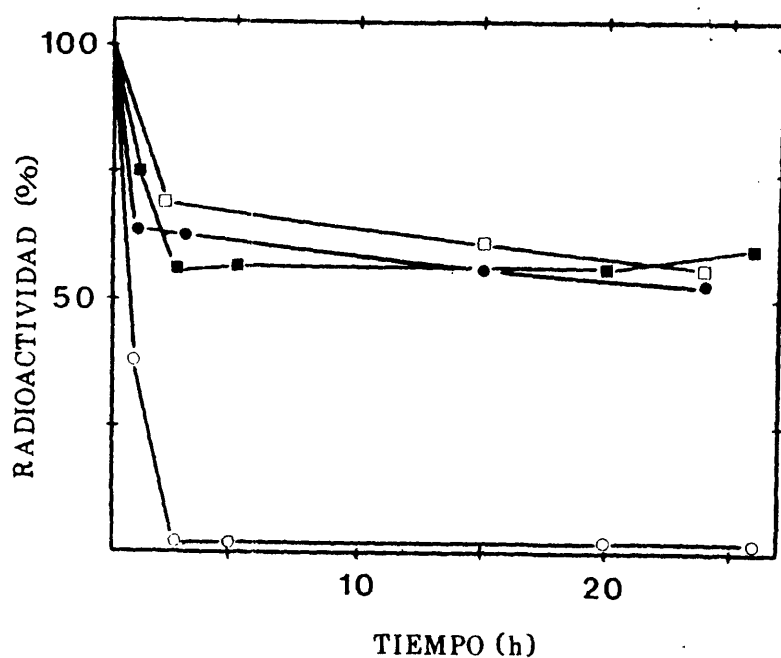


Figura 12.- Diálisis de las membranas sinaptosomales marcadas con (<sup>3</sup>H)-QNB y tratadas con Triton X-100. Las membranas sinaptosomales se marcaron con (<sup>3</sup>H)-QNB 0.9 nM y la radioactividad libre se eliminó por centrifugación. Las membranas se resuspendieron y trataron con Triton X-100 0.5%. El sobrenadante soluble de este tratamiento se separó por centrifugación a 100 000xg, 1 h. La diálisis se realizó contra 100 volúmenes de tampón de incubación. Membranas control (□-□); sobrenadante soluble en Triton X-100 0.5% (●-●); residuo insoluble en Triton X-100 0.5% (■-■); (<sup>3</sup>H)-QNB libre (○-○).

del marcaje, se dializaron contra 100 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4. Puede verse en la Fig. 11 que las membranas control y las tratadas con Triton X-100 0.5%, retienen una considerable cantidad de radioactividad durante más de 20 horas. En experimentos paralelos con una cantidad similar de (<sup>3</sup>H)-naloxona libre en presencia o ausencia de Triton X-100 0.5%, encontramos que en ambos casos había un rápido eflujo de radioactividad. Estos resultados indican que el Triton X-100 no favorece la disociación del ligando.

En el caso del receptor muscarínico, también pudo demostrarse la estabilidad del complejo (<sup>3</sup>H)-QNB-receptor. Después de marcar las membranas, una parte de ellas se sometió al tratamiento con Triton X-100 y se centrifugaron a 100 000xg durante 1 hora. El precipitado resultante se resuspendió en un volumen de tampón igual al inicial. Las membranas marcadas sin tratar con detergente, el precipitado resuspendido y el sobrenadante se dializaron contra 100 volúmenes de tampón Na/K PO<sub>4</sub> 50 mM, pH=7.4. Como puede verse en la Fig. 12, los blancos con droga libre pierden completamente al cabo de 2.5 horas de diálisis, mientras que en los demás casos queda retenida más del 50% de la radioactividad inicial después de 23 horas de diálisis. Por tanto, se puede concluir que el complejo (<sup>3</sup>H)-QNB-receptor también es estable a la acción del Triton X-100.

#### 6. Localización pre- y postsináptica de receptores centrales

Los resultados anteriormente mencionados sobre la estabi-

lidad de los complejos ligando-receptor, nos permitieron realizar los experimentos que se describen a continuación, en los que después de la fijación de los ligandos a las membranas, éstas se sometieron al tratamiento con Triton X-100.

Como se indicó en Métodos, las membranas sinaptosomales fueron sometidas a un tratamiento suave con Triton X-100 0.1 y 0.2% que disuelve la membrana presináptica (Figs. 13 y 14), y a un tratamiento más drástico con Triton X-100 0.5% que disuelve también la membrana postsináptica (202). Mediante el tratamiento con 0.1 y 0.2% hay una reducción de la radioactividad específica de un 15 y de un 40% respectivamente en el caso de la ( $^3\text{H}$ )-DHE, de un 15 y un 33% en el caso de la ( $^3\text{H}$ )-QNB y de un 33 y un 43% en el de la ( $^3\text{H}$ )-naloxona (Fig. 15). Estos resultados se hallan en marcado contraste con los obtenidos cuando las membranas sinaptosomales marcadas con ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC fueron tratadas con el detergente. En este caso, mediante el tratamiento con Triton X-100 0.1 y 0.2% la radioactividad específica aumenta en un 15 y un 70% respectivamente en relación a los controles no tratados (Fig. 15). El tratamiento más drástico con Triton X-100 0.5% disminuye en un 80% la actividad de la ( $^3\text{H}$ )-DHE, en un 64% la de la ( $^3\text{H}$ )-QNB y en un 93% la de la ( $^3\text{H}$ )-naloxona; pero en este caso, la actividad de la ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC también se reduce con respecto a los controles no tratados con detergente.

Como se verá en la Discusión, estos resultados sugieren que, mientras el receptor nicotínico tiene una predominante localización postsináptica (lo que confirma los resultados anteriores de De Robertis y col. (120)), los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, opiá



Figura 13.- Microscopía electrónica de las membranas sinap-  
tosomales purificadas por el procedimiento descrito en Métodos.  
Sólamante se observan las membranas de los terminales nerviosos  
(ms), algunas de las cuales muestran el complejo de unión (flechas)  
compuesto por las membranas sinaptosomales y por el retículo sub-  
sináptico (rs). Después del choque osmótico todavía quedan algu-  
nas vesículas sinápticas (vs). Ampliación x60 000.



Figura 14.- Membranas sinaptosomales después del tratamiento con Triton X-100 0.1%. Predominan los complejos de unión (cu). Con flechas se indica algunos de los complejos de unión en los que todavía se observa parte de la membrana presináptica. En comparación con la Fig. 13, se observa que las membranas presinápticas han desaparecido prácticamente. Ampliación x60 000.

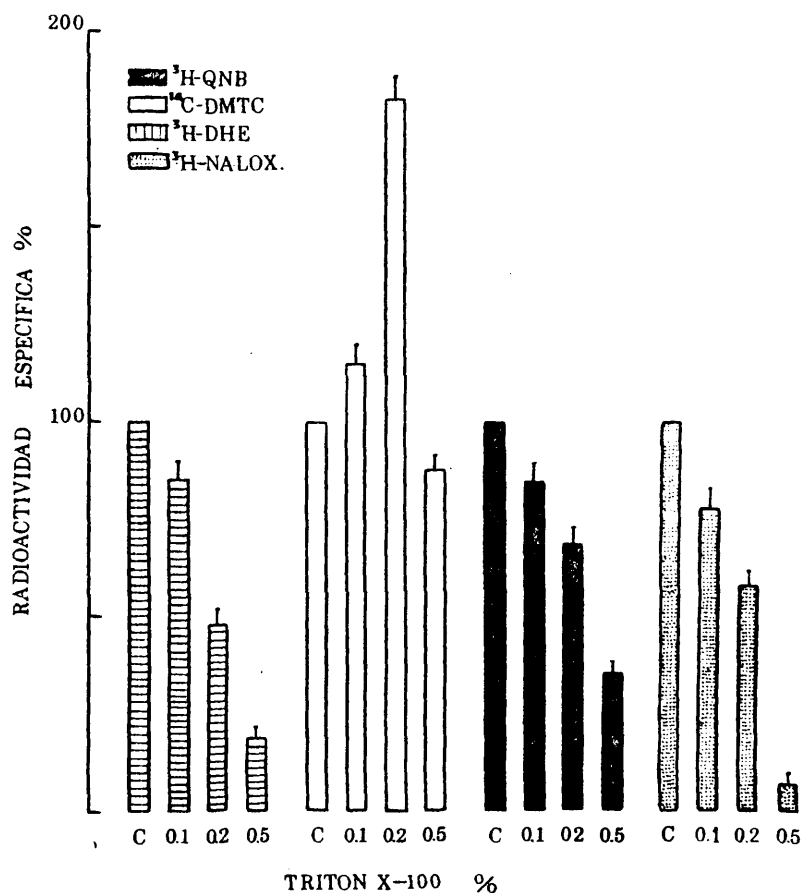


Figura 15.- Acción del Triton X-100 sobre las membranas sinaptosomales marcadas con (<sup>3</sup>H)-DHE 6nM, (<sup>14</sup>C)-DMTC 50 nM, (<sup>3</sup>H)-QNB 1.4 nM y (<sup>3</sup>H)-naloxona 10 nM. Las membranas marcadas se trataron con Triton X-100 0.1 y 0.2% por el procedimiento suave de De Robertis y col. (120), o por el procedimiento más drástico con Triton X-100 0.5% de Cohen y col. (202). Las membranas no disueltas se separaron por centrifugación a 100 000xg 1h y se resuspendieron en el tampón de incubación. En cada caso se hicieron determinaciones por duplicado de proteínas y radioactividad. La unión inespecífica se determinó en presencia de (-)norepinefrina 0.1 mM para la unión de (<sup>3</sup>H)-DHE, de DMTC 10 μM para la de (<sup>14</sup>C)-DMTC, de atropina 5 μM para la (<sup>3</sup>H)-QNB y de morfina 40 μM para la (<sup>3</sup>H)-naloxona. Los histogramas son los promedios de cuatro experimentos.

ceos y muscarínicos tienen una localización a la vez pre- y post-sináptica.

#### 7. Protección del receptor muscarínico por la atropina

En el caso del receptor muscarínico, los experimentos de protección con atropina (véase Métodos) demostraron que la unión del ligando específico era capaz de impedir la acción deleterea del Triton X-100 sobre el sitio receptor. También permitieron confirmar la localización pre- y postsináptica de estos receptores.

En este caso, el método consistió en unir el ligando frío al receptor. Posteriormente se trataron las membranas con el detergente y ambos (detergente y ligando frío) fueron eliminados por lavados y centrifugaciones, antes de realizar el ensayo de unión del ligando radioactivo.

El experimento que se muestra en la Fig. 16 se diseñó para determinar la concentración de atropina que después de lavar las membranas no interfiere en la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB. Puede verse que con concentraciones de atropina 1-2.5  $\mu\text{M}$  se recupera el 100% de unión específica de ( $^3\text{H}$ )-QNB, mientras que cuando se emplean concentraciones más altas, persiste el efecto inhibitorio de la atropina después de los lavados.

La protección del receptor muscarínico contra la acción del Triton X-100 se estudió empleando concentraciones de atropina 2.5 y 10  $\mu\text{M}$ . Como se muestra en la Fig. 17B, la atropina 2.5  $\mu\text{M}$  es capaz de contrarrestar casi completamente el efecto inhibitorio del Triton X-100  $10^{-1}\%$ . Empleando concentraciones más altas de detergente (p.e.,  $2 \times 10^{-1}$  y  $5 \times 10^{-1}$ ) la recuperación de la unión espe

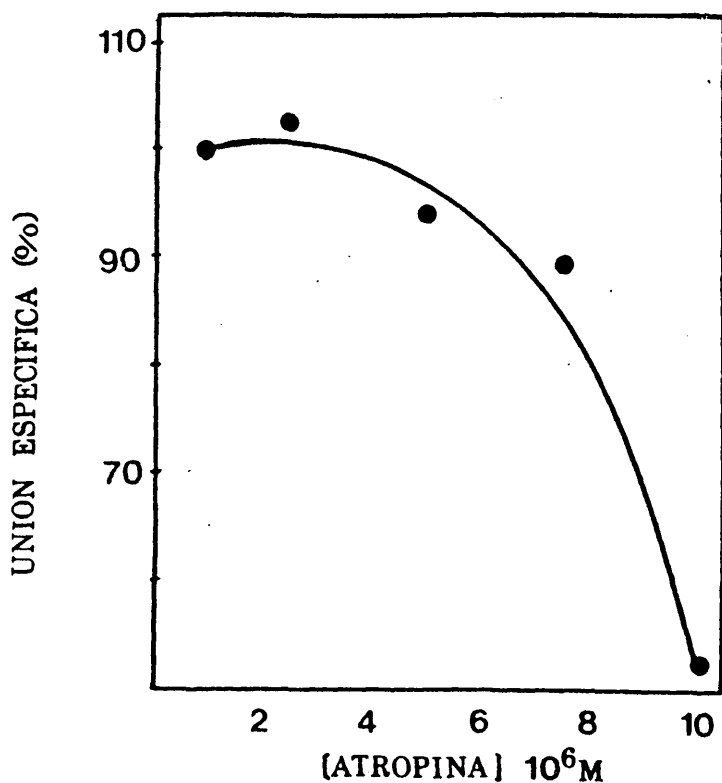


Figura 16.- Efecto de la preincubación de las membranas con atropina sobre la unión de (<sup>3</sup>H)-QNB. Las membranas (4 mg de proteínas por ml) se preincubaron con atropina a diferentes concentraciones durante 15 minutos a 25 °C, en tampón Na/K PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.4. Después de lavar las membranas por centrifugación y resuspensión, los ensayos de unión con (<sup>3</sup>H)-QNB 0.9 nM como se indica en Métodos. El 100% representa la unión específica a los controles sin tratar con atropina (1.7 pmol/mg de proteínas). Los puntos son las medias de dos experimentos independientes realizados por triplicado con una variación máxima del 5%.

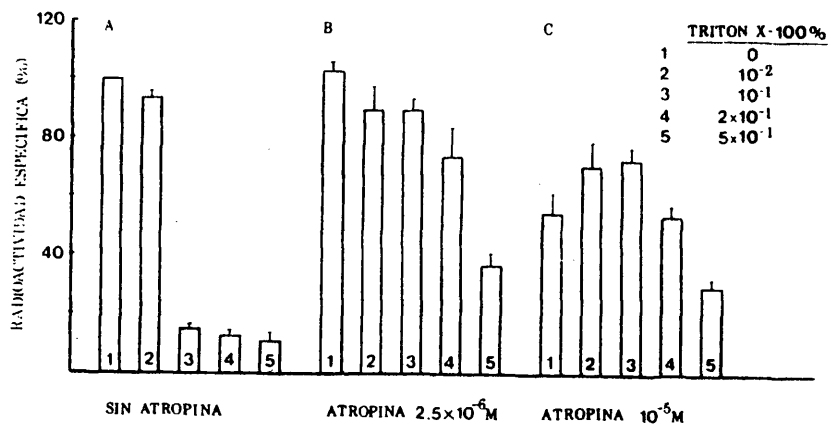


Figura 17.- Protección del receptor muscarínico. Las membranas sinaptosomales se incubaron durante 15 minutos a 25 °C con atropina, y luego se trataron con Triton X-100 a 0 °C durante 10 minutos. El detergente y la atropina se eliminaron por centrifugación y resuspensión. Los ensayos de unión se llevaron a cabo con (3H)-QNB 0.9 nM, como se indica en Métodos. El 100% representa la unión específica a los controles sin atropina ni detergente (1.7 pmol/mg de proteínas). Los histogramas son las medias de dos experimentos realizados por triplicado. A, experimento control sin atropina; B, protección con atropina 2.5  $\mu$ M; C, protección con atropina 10  $\mu$ M.

cífica es más baja, pero ello puede deberse a la solubilización del receptor (Tabla II).

A concentraciones más altas de atropina (10  $\mu\text{M}$ ) hay también protección, pero el efecto inhibitorio de este antagonista se puede observar aun después de los lavados (Figs. 16 y 17C). Un punto interesante es que a concentraciones de Triton X-100  $10^{-2}$  y  $10^{-1}\%$  la unión específica que se recupera es más alta que en los controles con sólo atropina 10  $\mu\text{M}$ . Esta observación podría interpretarse como que el detergente favorece el desplazamiento de la atropina de los sitios receptores.

Estos resultados contrastan con los que se obtienen cuando las membranas no se preincubaban con atropina antes del tratamiento con detergente (Fig. 17A). Empleando concentraciones de detergente mayores de  $10^{-1}\%$  se recupera menos del 15% de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB. Sin embargo, ha de hacerse notar que incubando con Triton X-100  $10^{-2}\%$  en ausencia de atropina se recupera más del 90% de la unión específica. Teniendo en consideración que la presencia de Triton X-100 a concentraciones mayores de  $10^{-2}\%$  inhibe totalmente la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB (Fig. 9), estos resultados indican que el efecto inhibitorio del detergente es reversible cuando éste se emplea a bajas concentraciones, e irreversible cuando se emplea a altas concentraciones.

En la tabla IV se muestra la protección producida por otras drogas colinérgicas. La concentración de droga que se empleó en todos los casos fue 2.5  $\mu\text{M}$ , y la del Triton X-100 fue  $10^{-1}\%$ . Puede observarse que la atropina es la droga que mejor protege el receptor muscarínico. La droga nicotínica d-metil tubocu-

TABLA IV  
PROTECCION DEL RECEPTOR MUSCARINICO POR VARIAS DROGAS  
COLINERGICAS DE LA ACCION DEL TRITON X-100

Droga	Protección (%)
Atropina	90 ± 4
Escopolamina	50 ± 5
Oxotremorina	44 ± 10
d-Metil tubocurarina	30 ± 9

Las membranas sinaptosomales (4 mg de proteínas por ml) se preincubaron con las distintas drogas a 2.5  $\mu$ M durante 15 minutos a 25 °C, luego se trataron con Triton X-100 0.1% a 0 °C durante 10 minutos. El detergente y la droga se eliminaron por centrifugación y resuspensión. Los ensayos de unión se realizaron con (<sup>3</sup>H)-QNB 0.9 nM como se indica en Métodos. Los valores son los promedios de dos experimentos separados realizados por triplicado.

rarina también ejerce cierta protección, pero menos que las drogas muscarínicas.

#### 8. Acción de los anestésicos locales sobre la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB

La acción de los anestésicos locales (procaína, tetracaína y dibucaína) y de las drogas adrenérgicas fentolamina y propranolol, que también tienen efecto anestésico, se estudiaron en un rango de concentración entre 1 nM y 500  $\mu\text{M}$ . Como se muestra en la Fig. 18, todas estas drogas inhiben la unión específica de ( $^3\text{H}$ )-QNB pero con diferente efectividad. Esto puede apreciarse mejor en la Tabla V, en la que se ha calculado la  $\text{IC}_{50}$  y la  $K_i$  para las distintas drogas. El inhibidor más potente es la procaína ( $K_i = 9 \mu\text{M}$ ) seguido por la tetracaína y la fentolamina. La dibucaína tiene una potencia intermedia, y el propranolol es el que con menos efectividad inhibe la unión específica de ( $^3\text{H}$ )-QNB ( $K_i = 80 \mu\text{M}$ ). Ninguna de estas drogas afecta la unión inespecífica de ( $^3\text{H}$ )-QNB.

Los resultados de la Fig. 18 se representaron en forma de logit-log (192) en la Fig. 19. Los coeficientes de Hill que se obtuvieron mediante esta representación, fueron todos próximos a la unidad (Tabla V); lo que sugiere que no hay cooperatividad entre los sitios de unión de los anestésicos y los de la ( $^3\text{H}$ )-QNB.

El efecto de los anestésicos se estudió también realizando las curvas de saturación de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB en presencia de las distintas concentraciones de procaína y propranolol. La representación de Scatchard se muestra en la Fig. 20, y la  $K_d$ ,  $E_{\text{max}}$  y  $N_H$ , calculados de estos experimentos, se muestran en la Tabla VI.

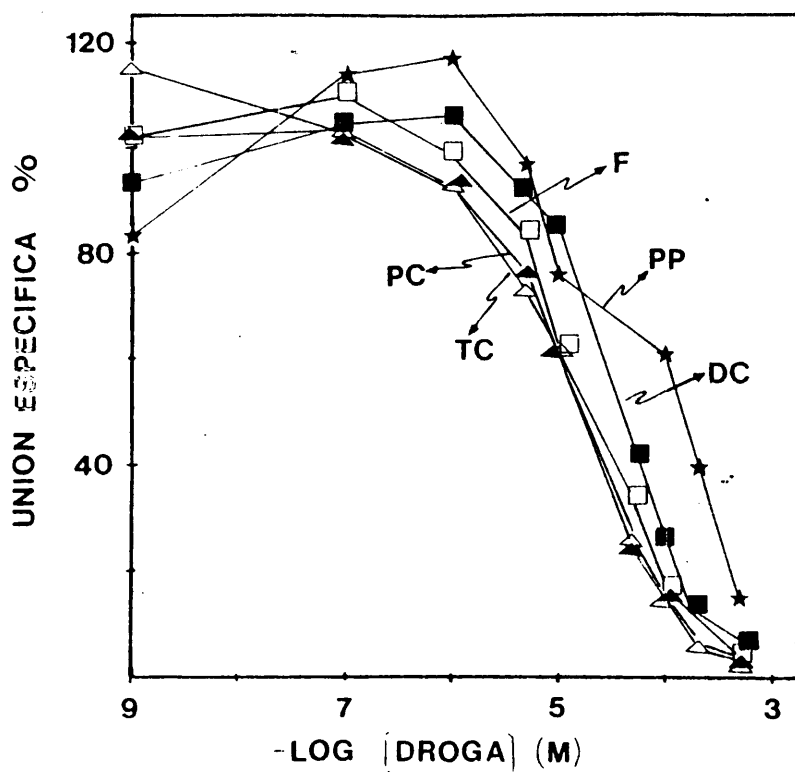


Figura 18.- Efecto de los anestésicos locales sobre la unión de  $(^3\text{H})\text{-QNB}$  a las membranas sinaptosomales crudas. La unión se realizó con  $(^3\text{H})\text{-QNB}$  0.2 nM, en presencia de concentraciones crecientes de anestésico. El 100% representa la unión específica a las membranas control en ausencia de anestésico ( $53 \pm 2$  pmol/mg de proteínas). Los puntos son los promedios de tres experimentos por triplicado, con una variación menor del 10%.

DC, dibucaína; PC, procaína; F, fentolamina; PP, propranolol; TC, tetracaína.

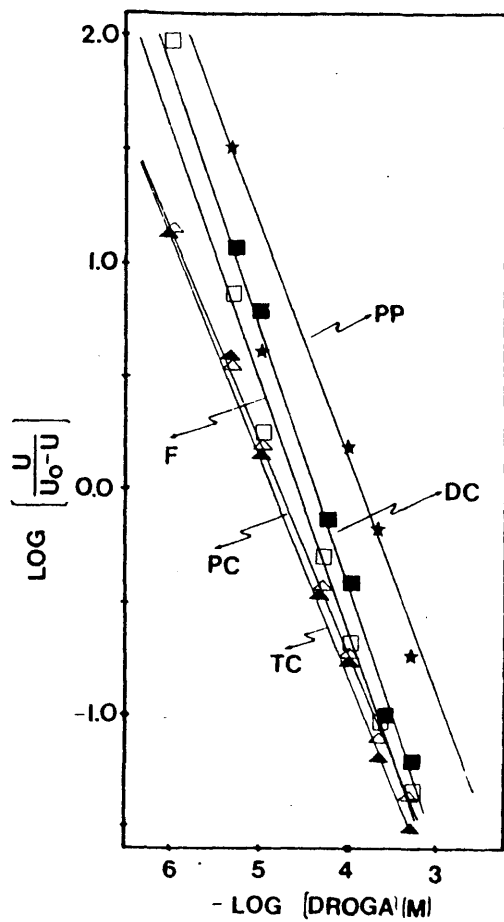


Figura 19.- Representación logit/log de la inhibición de la unión de  $(^3\text{H})\text{-QNB}$  por los anestésicos locales, obtenida a partir de los datos de la Fig. 18.  $U_0$  es la unión específica a las membranas control;  $U$ , la unión específica a las membranas en presencia de los anestésicos a las distintas concentraciones.

DC, dibucaína; PC, procaína; F, fentolamina; PP, propranolol; TC, tetracaína.

TABLA V  
 POTENCIA RELATIVA DE LOS ANESTESICOS EN LA INHIBICION DE LA  
 UNION DE (<sup>3</sup>H)-QNB A LAS MEMBRANAS SINAPTOSOMALES CRUDAS

Droga	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)	N <sub>H</sub>
Procaína	16	9	0.91
Tetracaína	18	10	1.00
Fentolamina	18	10	1.08
Dibucaína	40	22	1.18
Propranolol	180	80	1.07

La IC<sub>50</sub> y la K<sub>i</sub> se obtuvieron de las curvas de desplazamiento que se ilustran en la Fig. 18, el número de Hill (N<sub>H</sub>) de la representación logit/log de la Fig. 19.

La K<sub>i</sub> se calculó mediante la ecuación:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [(^3H)\text{-QNB}] / K_d)$$

donde IC<sub>50</sub> = concentración de droga que desplaza el 50% de unión específica.

K<sub>d</sub> = constante de disociación, calculada por la representación de Scatchard (Fig. 6)

[<sup>3</sup>H]-QNB = 0.2 nM

En comparación con las características de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB en el control, se observa que, por acción de las distintas concentraciones de procaína y propranolol, hay un aumento definido en la  $K_d$ , que corresponde a un descenso en la afinidad de la ( $^3\text{H}$ )-QNB por el receptor. En concomitancia con sus diferentes  $K_i$  (Tabla V), el efecto de la procaína es más marcado que el del propranolol.

También se observaron diferencias en la  $B_{\max}$ . Esta aumenta sobre el nivel del control con procaína  $0.1 \mu\text{M}$  y con propranolol  $100 \mu\text{M}$ , pero se reduce mucho a concentraciones altas de procaína. Estos resultados demuestran que, dependiendo de la concentración, el efecto de los anestésicos puede aparecer como competitivo o no-competitivo. Como será mencionado en la Discusión, este diferente comportamiento con la concentración, puede explicar algunos resultados contradictorios de la literatura.

Como las aminas anestésicas pueden competir con el  $\text{Ca}^{2+}$ , desplazándolo de las cargas negativas fijas de la membrana (177), llevamos a cabo experimentos de unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con y sin procaína. En la Tabla VII puede observarse que tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  como el  $\text{Mg}^{2+}$   $1 \text{ mM}$ , producen un ligero descenso (10-15%) en la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas. En combinación con la procaína, el  $\text{Ca}^{2+}$  produce solamente un ligero incremento de la inhibición que ejerce esta droga en la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB.

Previamente hemos mencionado que el efecto inhibitorio del Triton X-100 es reversible a bajas concentraciones, pero irreversible a concentraciones más altas (Fig.17). Para determi-

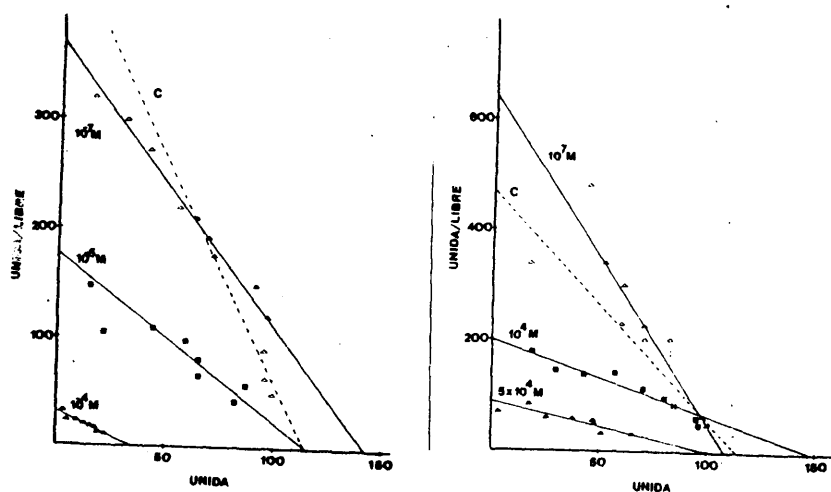


Figura 20.- Representación de Scatchard de la unión específica de  $(^3H)$ -QNB a las membranas sinaptosomales crudas en presencia de distintas concentraciones de procaína (A) y propranolol (B). La unión a las membranas (0.1 mg de proteínas por ml) se realizó como se indica en Métodos con concentraciones de  $(^3H)$ -QNB entre 0.1 y 2.0 nM. Los resultados son el promedio de tres experimentos por triplicado. La línea de trazos es el control en ausencia de anestésicos (Fig. 6).

TABLA VI

CONSTANTES DE LA UNIÓN DE (<sup>3</sup>H)-QNB EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE PROCAÍNA Y PROPRANOLOL

Droga	Concentración (μM)	K <sub>d</sub> (μM)	B <sub>max</sub> (pmol/g prot.)	N <sub>H</sub>
Control	—	0.25	114	0.89
Procaína	0.1	0.42	157	0.79
Procaína	10.0	0.64	115	0.97
Procaína	100.0	0.95	33	1.05
Propranolol	0.1	0.18	113	1.09
Propranolol	100.0	0.73	148	1.00
Propranolol	500.0	1.08	100	1.04

Las constantes de disociación (K<sub>d</sub>) y la unión máxima (B<sub>max</sub>), se calcularon mediante la representación de Scatchard de la Fig. 20. El número de Hill (N<sub>H</sub>) se calculó de los mismos experimentos.

TABLA VII  
 EFECTO DEL  $\text{Ca}^{2+}$  Y  $\text{Mg}^{2+}$  SOBRE LA UNIÓN DE ( $^3\text{H}$ )-QNB  
 A LAS MEMBRANAS SINAPTOSOMALES CRUDAS

Droga	(%)
Control	100
$\text{Ca}^{2+}$	$85 \pm 5$
$\text{Mg}^{2+}$	$91 \pm 6$
Procaína	$15 \pm 2$
Procaína+ $\text{Ca}^{2+}$	$12 \pm 1$
Procaína+ $\text{Mg}^{2+}$	$14 \pm 1$

Los resultados se expresan como porcentajes de unión con respecto a los controles sin procaína ni cationes divalentes ( $52 \pm 3$  pmol/g de proteínas). Se utilizaron las siguientes concentraciones de drogas:  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  y  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1 mM, procaína 10  $\mu\text{M}$  y ( $^3\text{H}$ )-QNB 0.2 nM. La unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas se realizó como se indica en Métodos. Los resultados son el promedio de tres experimentos por triplicado.

nar si la acción de los anestésicos era reversible o irreversible, desarrollamos experimentos similares. Como se muestra en la Tabla VIII, las membranas incubadas con los distintos anestésicos a la concentración de 500  $\mu\text{M}$  y luego lavadas, muestran una recuperación completa de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB. Sólomente en el caso de la fentolamina y la dibucaína hay una ligera inhibición. La Tabla VIII también muestra que los anestésicos no extraen proteínas de las membranas, en contraste con lo que ocurre en el caso del Triton X-100 0.2%. Esta concentración de detergente extrae un 40% de proteínas de las membranas y la mayor parte de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB queda irreversiblemente inhibida.

Los resultados obtenidos en los experimentos de protección se muestran en la Fig. 21. En esta figura, la línea cero corresponde a la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas tratadas sólomente con Triton X-100 0.2% (véase Tabla VIII). Puede observarse que la atropina protege los sitios de unión, y éstos se recuperan en un 200% sobre el control tratado sólomente con el detergente. Por el contrario, los anestésicos no protegen los sitios receptores, pudiendo incluso reducirlos por debajo del valor del control.

TABLA VIII  
 REVERSIBILIDAD DEL EFECTO DE LOS ANESTESICOS SOBRE LA  
 UNION DE (<sup>3</sup>H)-QNB A LAS MEMBRANAS SINAPTOSOMALES CRUDAS

Droga	Concentración	Proteínas (%)	Unión de ( <sup>3</sup> H)-QNB (%)
Control	—	100	100
Atropina	2.5 µM	104±2	101±10
Procaína	500.0 µM	107±1	102±4
Tetracaína	500.0 µM	105±2	111±15
Dibucaína	500.0 µM	111±9	91±3
Fentolamina	500.0 µM	108±8	85±3
Propranolol	500.0 µM	103±3	97±3
Triton X-100	0.2 %	64±4	21±3

Después del tratamiento con los distintos anestésicos a 25 °C durante 15 minutos o con Triton X-100 durante 15 minutos a 0°C, las membranas se lavaron como se indica en Métodos para los experimentos de protección. La unión se realizó con (<sup>3</sup>H)-QNB 1 nM. Los resultados se expresan como porcentaje de la cantidad de proteínas y como porcentaje de la unión de (<sup>3</sup>H)-QNB a las membranas control (91±5 pmol/g de proteínas). Los valores son el promedio de dos experimentos por triplicado.

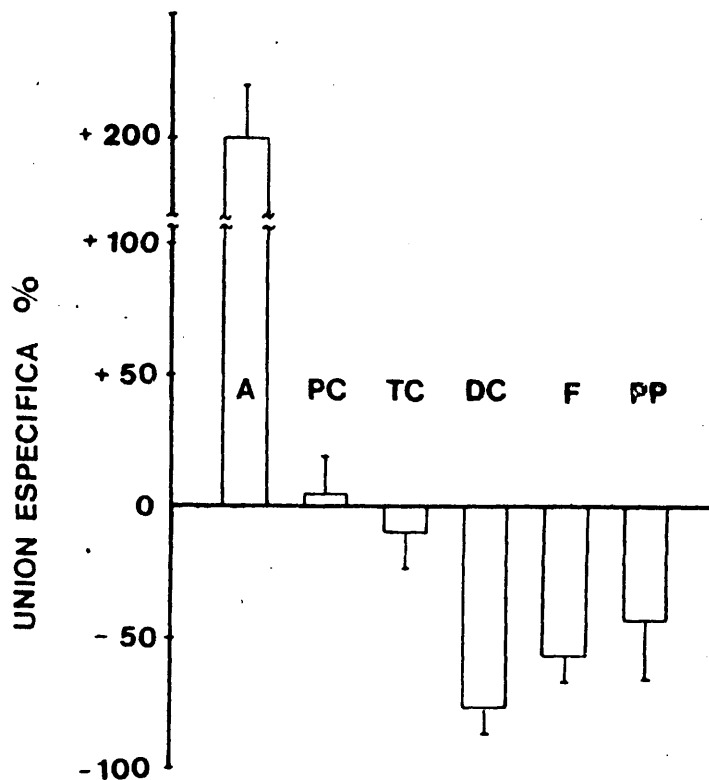


Figura 21.- Protección del receptor muscarínico. Las membranas sinaptosomales crudas se incubaron durante 15 minutos a 25 °C con atropina 2.5  $\mu$ M o los anestésicos locales 500  $\mu$ M, posteriormente se trataron con Triton X-100 0.2% a 0 °C durante 10 minutos. El detergente y las drogas se eliminaron por centrifugación y resuspensión. Los ensayos de unión se realizaron por triplicado con ( $^3$ H)-QNB 1 nM como se indica en Métodos. La línea 0 representa la radioactividad específica ( $19 \pm 3$  pmol/g de proteínas) de las membranas control tratadas solamente con Triton X-100 (En la Tabla VIII la inhibición causada por el Triton X-100 se expresa como porcentaje de la unión específica). Los porcentajes positivos indican protección y los negativos mayor inactivación. Los resultados son el promedio de dos experimentos por triplicado. Nótese que la única droga que protege es la atropina (A). PC, procaína; TC, tetracaína; DC, dibucaína; F, fentolamina; PP, propranolol.

62

## V - DISCUSION

Se considerarán en este capítulo los resultados citados anteriormente en relación con los datos de la literatura. También se discutirán estos resultados desde el punto de vista de su validez experimental y de los problemas que pueden plantearse en futuras investigaciones.

En secciones sucesivas analizaremos los resultados sobre:

1) la especificidad y características cinéticas de la unión ligando-receptor a las membranas de cerebro; 2) el efecto de los detergentes sobre la citada unión; 3) la localización pre- y postsináptica en relación con la membrana del sinaptosoma; 4) la protección del sitio receptor muscarínico por ligandos específicos y 5) la acción de los anestésicos locales y drogas con efecto anestésico sobre la unión de ligandos al receptor muscarínico.

#### 1. Especificidad de la unión de los ligandos radioactivos a los distintos receptores

Los resultados sobre la unión específica de ( $^3\text{H}$ )-DHE a las membranas sinaptosomales de los ganglios basales del gato se muestran en la Fig. 2. Estos resultados confirman los obtenidos por Greenberg y Snyder (198) en homogeneizados de diferentes regiones de cerebro de rata. La saturación a las concentraciones de 4-6 nM de ( $^3\text{H}$ )-DHE obtenida por nosotros, es coincidente con la encontrada por Peroutka y col. (206) en los homogeneizados de cerebro de vaca; pero diferente de la observada por Davis y col. (207) quienes obtuvieron una saturación a 40 nM en el cerebro de rata. Por la representación de Scatchard (Fig. 2B), se obtiene una constante de disociación  $K_d=3.7$  nM que es intermedia entre la de corteza

cerebelar (4.1 nM) y la corteza cerebral (1.6 nM). Por otra parte, Davis y col. obtuvieron una  $K_d$  mucho más alta (8.4 nM). Tanto la representación de Scatchard como el número de Hill (Fig. 2 A y B) confirman que hay un sólo tipo de sitios de unión e independientes para la ( $^3\text{H}$ )-DHE en las membranas sinaptosomales de los núcleos basales.

El número máximo de sitios de unión obtenidos por Greenberg y Snyder (198) fue de 21 pmol/g de tejido fresco. A partir de este valor, y teniendo en cuenta que en 1 g de cerebro de rata homogeneizado y centrifugado hay 100 mg de proteínas (208), calculamos un valor de 210 pmol/g de proteínas. En nuestro caso, la unión máxima determinada mediante la representación de Scatchard es 1000 pmol/g de proteínas, es decir, casi cinco veces más alta. Esto sugiere que, durante la separación de las membranas sinaptosomales, se ha producido una purificación de los  $\alpha$ -adrenorreceptores de unas cinco veces.

Los estudios de competición con los agonistas y antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, el agente bloqueante  $\beta$ -adrenérgico (+)propranolol y los neurotransmisores serotonina y dopamina (Fig. 3 y Tabla I), confirman que la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE es específica para los  $\alpha$ -adrenorreceptores a las concentraciones que empleamos.

Estos resultados están de acuerdo con los de Greenberg y Snyder, pero difieren de los de Davis y col. (207). Estos investigadores, trabajando a concentraciones más altas de ( $^3\text{H}$ )-DHE, encontraron que la serotonina podía desplazar su unión con una  $K_i = 1.9 \mu\text{M}$ , y la dopamina con una  $K_i = 8.0 \mu\text{M}$ ; mientras que la  $K_i$  para la (-)norepinefrina era de  $3.4 \mu\text{M}$ . A partir de estos resultados

concluyeron que la ( $^3\text{H}$ )-DHE podía unirse no sólo a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, sino también a los receptores de dopamina y serotonina. En nuestro caso, la  $K_i$  para la (-)norepinefrina es  $0.8 \mu\text{M}$ , y para la serotonina y dopamina  $16$  y  $55 \mu\text{M}$  respectivamente (Tabla I). A partir de estos datos podemos concluir que, a las bajas concentraciones que empleamos, la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE es fundamentalmente a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Como veremos más adelante al hablar de los anestésicos locales, el efecto de la dopamina, la serotonina y el propranolol en concentraciones micromolares sobre el receptor  $\alpha$ -adrenérgico, puede deberse a una alteración de la membrana más que a una acción directa de estas drogas sobre el sitio receptor.

Las características de la unión de ( $^3\text{H}$ )-naloxona a los receptores opiáceos de las membranas sinaptosomales de los ganglios basales, obtenidas por nosotros, están de acuerdo con los resultados de la literatura. En homogeneizados totales de cerebro de rata, Pasternak y Snyder (209) encontraron un sitio de alta y otro de baja afinidad, con constantes de disociación de  $0.4$  y  $30 \text{ nM}$  respectivamente. Posteriormente, Squires y Braestrup (200) confirmaron la presencia de dos tipos distintos de sitios de unión de ( $^3\text{H}$ )-naloxona y otras características diferenciales, como una distribución regional distinta. Las constantes de disociación que encontramos en las membranas sinaptosomales fueron  $K_{d1} = 3,7 \text{ nM}$  y  $K_{d2} = 35 \text{ nM}$ . Squires y Braestrup encontraron una  $B_{\text{max}}$  para el sitio de alta afinidad de  $3 \text{ pmol/g}$  de tejido, y de  $11 \text{ pmol/g}$  de tejido para el sitio de baja afinidad. De la misma forma que anteriormente, podemos calcular  $30 \text{ pmol/g}$  de proteínas y  $110$

pmol/g de proteínas para los sitios de alta y baja afinidad respectivamente. En nuestro caso las  $B_{\max}$  fueron 79 pmol/g y 224 pmol/g de proteínas respectivamente, lo que indica que también los receptores opiáceos fueron parcialmente purificados al separarse las membranas sinaptosomales.

En cuanto al receptor muscarínico, como puede observarse en la Fig. 5, la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas sinaptosomales sigue una curva de saturación hiperbólica, alcanzándose la saturación entre 0.8 y 1 nM de ( $^3\text{H}$ )-QNB. La representación de Scatchard es una línea recta, lo que indica un sólo tipo de sitios de unión. A partir de esta representación, se calcula una  $K_d=0.34$  nM, similar a la obtenida por Yamamura y Snyder en la fracción mitocondrial (201), y una  $B_{\max}=2.2$  nmol/g de proteínas. En las membranas sinaptosomales crudas, que están menos puras, obtuvimos una  $K_d=0.25$  nM y una  $B_{\max}=114$  pmol/g de proteínas (Fig. 6). Este valor de la  $B_{\max}$  indica que en la fracción sinaptosomal cruda el receptor muscarínico está menos purificado. También se observa que la  $K_d$  en la fracción sinaptosomal pura es más alta que en la cruda. Hemos de tener en cuenta que en el caso de las membranas sinaptosomales puras, la concentración del receptor muscarínico (calculada por los datos de la representación de Scatchard) fue de 0.11 nM, es decir, mayor que  $K_d/10$ . Cuando se utilizan concentraciones de receptores mayores que  $K_d/10$ , los valores de la  $K_d$  calculados por la representación de Scatchard pueden aumentar cuando se aumenta la concentración de receptor (205). En los demás casos este problema no se ha presentado porque se trabajó a concentraciones de receptor menores que  $K_d/10$ .

En términos generales, podemos concluir que los valores de  $K_d$ ,  $B_{max}$  y otras características de los receptores centrales estudiados ( $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y muscarínicos) coinciden con los obtenidos anteriormente por otros autores. Sin embargo, cabe destacar que el método de fraccionamiento utilizado por nosotros, lleva a una mayor purificación en el aislamiento de la membrana sinaptosomal, por lo que, en todos los casos, obtuvimos un valor de la  $B_{max}$  mayor. Esto está de acuerdo con una mayor concentración de los sitios receptores en las membranas sinaptosomales.

## 2. Efecto de los detergentes sobre la unión específica de los ligandos a los receptores

El tratamiento de las membranas con detergentes produce un efecto diferente sobre los distintos receptores. Por ejemplo, el receptor colinérgico nicotínico de diversos tejidos es resistente al Triton X-100, y al deoxicolato, los cuales han sido empleados para su solubilización y purificación (201). También han podido ser solubilizados mediante detergentes los receptores al GABA (211) y a las benzodiazepinas (212,213). Otros receptores, por el contrario, son muy sensibles a la acción de los detergentes, como por ejemplo, los opiáceos (214) y los  $\alpha$ -adrenérgicos (215); por lo que estos receptores sólo han podido caracterizarse en forma soluble mediante la unión previa de ligandos que forman complejos muy estables (216,217). En nuestro trabajo, estudiamos el efecto de los detergentes sobre los neuroreceptores de las membranas sinaptosomales, con la finalidad, como se

dijo en la Introducción, de disolver la membrana presináptica. Estos estudios se realizaron fundamentalmente con los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y opiáceos.

En la Fig. 7 puede apreciarse que el Triton X-100 produce inhibición de la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE aun a concentraciones muy bajas. Por el contrario, el Nonidet P-40, el deoxicolato y la digitonina, a bajas concentraciones, aumentan la unión, mientras que a concentraciones altas la inhiben. La estimulación es particularmente evidente con deoxicolato  $10^{-4}\%$  (135% de estimulación) y con la digitonina  $10^{-4}\%$  (80%). Estos dos detergentes poseen en su estructura un grupo de ciclopentanoperhidrofenantreno, por lo que se puede especular que la estimulación se deba principalmente a este grupo.

En el caso de los opiáceos, todos los detergentes tienen una acción deleterea sobre el sitio receptor, que es fuertemente inhibido a concentraciones superiores a  $10^{-3}\%$ . Excepciones fueron el deoxicolato y el Nonidet P-40 a la concentración de  $10^{-4}\%$ , con las cuales la unión específica se estimula en un 50%. Estos dos detergentes no presentan ningún grupo común en su estructura, por lo que no es posible atribuir la estimulación a ningún grupo concreto.

El mecanismo que determina la estimulación de estos receptores no está todavía aclarado. Una posibilidad es que se deba al descubrimiento de receptores latentes a causa del desplazamiento de los lípidos por el detergente. Otra posibilidad es que se deba a un cambio de afinidad o cooperatividad de la unión del ligando a los sitios receptores. Estas alternativas de interpreta

ción serán motivo de investigaciones experimentales a realizar en el futuro.

El efecto del Triton X-100 sobre la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB al receptor muscarínico (Fig. 9), confirma los resultados de Beld y Ariëns (218) y de Aronstam y col. (219), que demuestran la inhibición de la unión de drogas muscarínicas por los detergentes no iónicos, cuando se emplean a concentraciones que solubilizan las proteínas de la membrana (mayores de 0.1%). Además se puede observar que, a concentraciones entre  $10^{-4}$  y  $10^{-3}\%$  de detergente, ya existe una inhibición significativa. Esta inhibición es del 100% cuando se utiliza Triton X-100  $10^{-2}\%$ .

Como se muestra en la Tabla III, los detergentes a la concentración de  $10^{-2}\%$  no producen una solubilización significativa de las proteínas de la membrana. Por tanto, la inhibición producida por estas concentraciones de detergente, es difícil que se deba a la extracción de receptores de la membrana. Por el contrario, los detergentes a  $10^{-1}\%$ , ya pueden extraer proteínas de la membrana (Tabla II); por lo que la inhibición producida por esta concentración puede deberse, en parte, a la solubilización de los receptores. Cabe destacar que en el caso del receptor muscarínico, la inhibición producida por el Triton X-100 es, dentro de ciertos límites, reversible (véase más adelante). Esto significa que, eliminando el detergente de las membranas, se recupera la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB. Sin embargo, a concentraciones altas de detergente, su efecto es en gran medida irreversible.

El efecto causado por los detergentes sobre los neuroreceptores, puede estar relacionado con el requerimiento lipídico

de estas macromoléculas para desempeñar su función. Este requerimiento lipídico está bien determinado en el caso de diversas enzimas de membrana (220,221) y de algunos receptores (222-224). Nuestros resultados indican que los detergentes tienen una acción sobre los neurorreceptores similar a la que tienen sobre algunas enzimas (225,226). La acción de los detergentes puede deberse a un cambio en la fluidez de la membrana, dado que ésta afecta la actividad de ciertas enzimas (227). Dependiendo de la concentración, los detergentes pueden también alterar las interacciones lípido-proteína. Dado que los lípidos pueden modular la conformación de las proteínas (228), la perturbación producida por el detergente puede deberse a un cambio de conformación del receptor causado por el desplazamiento de sus lípidos asociados.

### 3. Localización pre- y postsináptica de los receptores.

Como se mencionó en la introducción, durante los últimos diez años, un número cada vez mayor de evidencias farmacológicas han llevado a postular la existencia de receptores presinápticos. Sin embargo, hasta el presente no existía ninguna evidencia bioquímica que avalara la existencia de estos receptores en los terminales nerviosos. Nosotros hemos abordado el problema de la diferenciación de los receptores pre- y postsinápticos aprovechando la solubilización selectiva de la membrana presináptica, mediante el tratamiento suave de las membranas sinaptosomales con Triton X-100 (120,172). De acuerdo con estos estudios, en el caso de un receptor situado en la membrana postsináptica, cabe esperar que su concentración por unidad de proteína aumente cuando

se elimina la membrana presináptica. Por el contrario, si parte del receptor está localizado en la membrana presináptica, su concentración debe disminuir cuando se disuelve la membrana presináptica.

Dado que los detergentes inactivan los receptores a concentraciones que pueden solubilizar la membrana presináptica, en nuestro trabajo tuvimos que marcar primero los receptores con ligandos radioactivos y, posteriormente, disolver la membrana presináptica. Tal estudio, requería comprobar previamente que el Triton X-100 no disociaba el complejo ligando-receptor (Figs. 10-12).

El tratamiento con Triton X-100 de las membranas sináptomas, marcadas con los distintos ligandos antes mencionados, produce la solubilización de un complejo ligando-receptor que es bastante estable. Esto pudo demostrarse mediante la diálisis de las membranas tratadas con detergente (Figs. 10-12). Al mismo tiempo, en el sedimento residual al tratamiento con Triton X-100 0.1-0.2%, la radioactividad específica por unidad de masa de proteínas disminuye en el caso de la ( $^3\text{H}$ )-DHE, ( $^3\text{H}$ )-naloxona y ( $^3\text{H}$ )-QNB (Fig. 15). Estos resultados pueden compararse con los obtenidos con el agente nicotínico ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC, en cuyo caso la radioactividad específica aumenta en un 15 y un 75% respectivamente, al tratar las membranas con Triton X-100 0.1 y 0.2%. A estas concentraciones de detergente, hay una solubilización preferencial de la membrana presináptica, como se observa por microscopía electrónica (Figs. 13-14). Una forma de interpretar estos resultados, es que los receptores nicotínicos son fundamentalmente postsinápti-

cos; mientras que los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y muscarínicos, son parcialmente pre- y postsinápticos. Esta interpretación, está apoyada por los resultados obtenidos cuando se utilizó el tratamiento de Cohen y col. (202) con Triton X-100 0.5%, el cual disuelve también la membrana postsináptica. En este caso, hay un marcado descenso de la radioactividad específica de la ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC, y un descenso todavía mayor de la radioactividad específica de la ( $^3\text{H}$ )-DHE, ( $^3\text{H}$ )-naloxona y ( $^3\text{H}$ )-QNB.

Otra interpretación de estos resultados, podía ser que los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y muscarínicos, se solubilizaran más fácilmente que los nicotínicos. Aunque esta interpretación no puede descartarse, parece poco probable por ser difícil disolver una proteína intrínseca (como es el caso de los receptores) sin desintegrar la membrana.

En el caso del receptor muscarínico, algunos autores postularon que podía ser extraído con altas concentraciones de  $\text{ClNa}$  (229,230), lo cual significaría que este receptor no es una proteína intrínseca. Sin embargo, esto no ha podido ser confirmado por otros autores (218,219,231). En vista de ello, tratamos las membranas sinaptosomales con  $\text{ClNa}$  2 M, y encontramos la misma cantidad de unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB que en los controles. Por lo tanto, no parece que el receptor se extraiga de las membranas con altas concentraciones de sal, lo que indica que el receptor muscarínico es una proteína intrínseca de la membrana.

También existe la posibilidad de que ciertos receptores estén localizados en las membranas de las células gliales, las cuales pueden contaminar la fracción sinaptosomal (192), y que el

tratamiento con Triton X-100 disuelva estas membranas, dando lugar a una reducción en la concentración de receptores. Aunque esta posibilidad no se puede descartar, parece poco probable, pues si hay receptores en estas membranas, deben estar en baja concentración; ya que en la purificación de las membranas sinaptosomales hay una reducción en la cantidad de membranas gliales a la vez que se produce una concentración de receptores. Por lo tanto, la solubilización de las membranas gliales produciría un aumento en la concentración de receptores, y no una reducción como la que tenemos.

La localización pre- y postsináptica de los distintos receptores, sugerida por estos resultados, está en conformidad con los datos descritos en la literatura. La localización de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en la membrana presináptica, proporciona una base estructural para explicar la existencia del mecanismo de retroalimentación que regula la liberación de ( $^3\text{H}$ )-norepinefrina, como se observó en la estimulación de cortes cerebrales (139-142) o en los sinaptosomas aislados (157). U'Prichard y col. (169,170), utilizaron la inyección intraventricular de 6-hidroxi-dopamina, la cual destruye los terminales noradrenérgicos (232), en un intento de determinar la localización estructural de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. Encontraron un ligero aumento en la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE y concluyeron que estos receptores eran total o parcialmente postsinápticos. Este abordaje tiene el inconveniente de que una reducción substancial de los receptores presinápticos, podría ser enmascarada por un aumento en los receptores postsinápticos, debido a la supersensibilidad por denervación.

Existen evidencias indirectas de la localización presináptica de los receptores opiáceos derivadas de estudios farmacológicos. Montel y col. (155) observaron que la morfina y la naloxona podían afectar la liberación de noradrenalina de los cortes cerebrales. Cuando se cortan las raíces dorsales de la médula espinal, hay una reducción del 50% de la unión de ( $^3\text{H}$ )-naloxona en los cuernos dorsales de la médula (233). Pollard y col. (234), utilizando diversos métodos para destruir las fibras dopaminérgicas que llegan al estriado, concluyeron que la principal función de las encefalinas podía ser intervenir en la inhibición presináptica de los diferentes sistemas neuronales del sistema nervioso central. La destrucción de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus produce un descenso significativo de la unión de ( $^3\text{H}$ )-naloxona en la corteza cerebral y en el cerebelo, lo que sugiere que los receptores opiáceos están localizados en las terminales noradrenérgicas de estas regiones (156).

También se tienen evidencias de que el efecto inhibitorio de los opiáceos se ejerce mediante una acción postsináptica sobre los cuerpos celulares y las dendritas. Cuando los opiáceos se aplican a las neuronas, éstas se hacen menos sensibles a la acción excitatoria de neurotransmisores tales como la acetilcolina o el glutamato (235). De acuerdo con Snyder y Simantov (236) las neuronas encefalitogénicas pueden hacer sinapsis axo-axónicas que median la inhibición presináptica en ciertas partes del cerebro, mientras que en otras regiones pueden hacer sinapsis axo-dendríticas o axo-somáticas implicadas en la inhibición postsináptica.

Los receptores muscarínicos presinápticos pueden estar implicados en los mecanismos de retroalimentación negativa de liberación de acetilcolina en córtices cerebrales (144,145). Las drogas muscarínicas también inhiben la liberación de acetilcolina en el hipocampo (166), aunque cuando se destruye las vías colinérgicas que van del septum al hipocampo, no se observa reducción en el número de receptores muscarínicos del hipocampo (167). Sin embargo, en este último caso, la denervación podría haber producido un aumento de receptores postsinápticos.

Nuestros resultados sugieren una localización fundamentalmente postsináptica de los receptores nicotínicos en la corteza cerebral. Recientemente, se ha postulado la existencia de receptores nicotínicos presinápticos en el sistema nervioso central, los cuales pueden estar implicados en la regulación de la liberación de catecolaminas (237,238). Esta aparente contradicción puede deberse a que el número de receptores nicotínicos presentes en los terminales nerviosos sea mucho más bajo que en la membrana postsináptica. De esta forma, al disolver la membrana presináptica se elimina una cantidad muy pequeña de receptores en comparación con otras proteínas, lo que da lugar a un aumento en el número de receptores por unidad de proteína.

Aunque se ha postulado la existencia de una gran variedad de receptores presinápticos (124,125), su significado fisiológico no está bien esclarecido todavía (126). Una posible interpretación de su papel fisiológico está basada en el hecho de que la regulación de la liberación es alta a bajas frecuencias de estimulación, mientras que a altas frecuencias es menos significati-

va. Por tanto, los estímulos fuertes, que generalmente tienen significado fisiológico, no están sujetos a inhibición presináptica. De acuerdo con esto, un posible papel de los receptores presinápticos es eliminar la actividad no deseada producida por los estímulos de baja frecuencia, más que proteger la célula blanco de la sobredosis de transmisor producida por los estímulos fuertes (126).

Los receptores presinápticos también pueden desempeñar un papel muy importante en los mecanismos celulares y moleculares del comportamiento. De esta manera, los estudios de Kandel en moluscos (239) demuestran que los fenómenos de sensibilización (aumento de una respuesta ante un estímulo inocuo como resultado de la presentación de un segundo estímulo nocivo) existe la intervención de una neurona que, actuando presinápticamente, produce una facilitación de la liberación del neurotransmisor. Estos efectos moduladores de la liberación del neurotransmisor por mecanismos presinápticos pueden tener una importancia trascendental en los fenómenos de aprendizaje, memoria y comportamiento. Finalmente, existe la posibilidad de que se produzcan cambios tanto en la sensibilidad como en el número de receptores presinápticos del sistema nervioso central o periférico, en enfermedades como la hipertensión esencial, la esquizofrenia y la depresión (138).

La existencia de receptores presinápticos tiene además importantes implicaciones en farmacología y terapéutica, puesto que existen drogas con mayor afinidad para los receptores presinápticos que para los postsinápticos y viceversa (138,240). Consecuentemente, en el análisis de los efectos farmacológicos y terapéuticos de estas drogas, deben ser considerados sus efectos presi-

nápticos y postsinápticos, además de su acción agonista o antagonista.

#### 4. Protección del receptor muscarínico

Como se dijo anteriormente, el detergente no-iónico Triton X-100 inactiva al receptor muscarínico. Los resultados que se muestran en la Fig. 17 indican que, según la concentración de detergente que se utilice, la inhibición puede ser reversible o irreversible. Por ejemplo, con Triton X-100  $10^{-2}\%$  más del 90% de la inhibición puede revertirse mediante lavados de las membranas. Por el contrario, con Triton X-100  $10^{-1}\%$ , sólo el 15% de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB puede recuperarse después de la eliminación del detergente.

Estos resultados demuestran que bajo la acción de los detergentes se produce una alteración del sitio receptor, y que tal alteración puede ser más o menos permanente, dependiendo de la concentración inicial del detergente.

El posible mecanismo de la inhibición por el Triton X-100 es desconocido. Una posibilidad podría ser una acción del detergente sobre los lípidos de la membrana. Como los lípidos pueden modular la conformación de las proteínas de la membrana (228) y el receptor muscarínico tiene requerimientos lipídicos para su actividad (222), es posible que el Triton X-100 a baja concentración desplace ciertos lípidos asociados con la proteína receptora, induciendo un cambio de conformación reversible. A concentraciones altas, el detergente puede extraer estos lípidos e inducir un cambio de conformación irreversible. Por otro lado, la unión

de los antagonistas muscarínicos tiene lugar parcialmente a una zona hidrofóbica del receptor (241). Por tanto, es posible que algunos lípidos formen parte del sitio receptor, y el desplazamiento o extracción de estos lípidos por el detergente, produzca respectivamente una inactivación reversible o irreversible del receptor. Por último, también es posible que el detergente actúe directamente sobre la proteína receptora induciendo un cambio de conformación reversible o irreversible.

El hecho de que el complejo ligando-receptor fuera estable a la acción de los detergentes, nos indujo a pensar que la unión de un ligando específico podría proteger el receptor de la acción inhibitoria del detergente. A tal fin se realizaron los experimentos que se muestran en la Fig 17 B y C.

La conclusión más importante que se deduce de estos experimentos es que el receptor puede ser protegido si está ocupado por un ligando específico como la atropina. Furchgott propuso que la acción inhibitoria que ejercía la dibenamina por unión irreversible a los distintos receptores de músculo liso, era impedida cuando los diversos ligandos se unían a sus correspondientes receptores. Posteriormente, la atropina fue utilizada por otros autores para proteger al receptor muscarínico de músculo liso de la acción de la dibenamina (175,176). Es interesante que esta regla general de la Farmacología en tejido completo (174) es también aplicable a la membrana a nivel molecular. Así pues, cuando la atropina se usa a la debida concentración, protege el sitio receptor. Por otra parte, cuando se emplean concentraciones altas de atropina, se tiene una inhibición residual del receptor

que es parcialmente revertida por el Triton X-100 (Fig. 17 C). En nuestros experimentos se encontró que las demás drogas muscarínicas no son tan eficaces como la atropina en la protección del receptor muscarínico (Tabla IV), pero es interesante notar que incluso el agente nicotínico dimetil-d-tubocurarina ejerce una pequeña protección del receptor muscarínico.

Como la atropina induce una isomerización del receptor (241,242), es posible que en este estado el receptor sea más estable a la acción del detergente. Esta mayor estabilidad podría deberse a que la proteína receptora, isomerizada por el ligando, interaccionara más fuertemente con los lípidos asociados, y éstos no sean extraídos por el detergente. No obstante, estos experimentos no aclaran el mecanismo por el cual los ligandos protegen al receptor.

Los porcentajes de unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas protegidas con atropina y luego tratadas con concentraciones crecientes de Triton X-100, coinciden con los obtenidos cuando las membranas previamente marcadas con ( $^3\text{H}$ )-QNB, se sometieron al mismo tratamiento con detergente. Por tanto, estos resultados apoyan las conclusiones anteriores sobre la localización pre- y postsináptica del receptor muscarínico.

Mediante la protección del receptor muscarínico con atropina, es ahora posible disolver la membrana presináptica con detergente y, posteriormente, llevar a cabo estudios de unión de drogas a los sitios postsinápticos.

La protección del receptor muscarínico de la acción deletérea de los detergentes, sugiere que otros receptores sensibles

a los detergentes pueden también ser protegidos. Por otra parte, la protección podría ser útil para solubilizar el receptor en forma activa, lo que permitiría purificarlo como una macromolécula bien definida.

##### 5. Acción de los anestésicos locales sobre los receptores muscarínicos centrales

Los resultados descritos en el capítulo anterior demuestran que los anestésicos locales procaína, tetracaína y dibucaina, y también los agentes bloqueantes adrenérgicos fentolamina y propranolol, cuando se utilizan en concentraciones micromolares, producen una inhibición de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas sinaptosomales. Esta inhibición es más efectiva con procaína ( $K_1=9 \mu\text{M}$ ) y menor con el propranolol ( $K_1=80 \mu\text{M}$ ) (Tabla V). La inhibición producida por estas drogas sobre la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB es reversible y puede eliminarse mediante lavados. Además los anestésicos no extraen proteínas de las membranas (Tabla VIII).

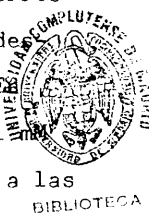
La inhibición de los receptores centrales por los anestésicos ha sido observada en el caso del receptor opiáceo (189, 190) el  $\alpha$ -adrenérgico (191) y el muscarínico (191). El hecho de que los anestésicos locales inhiban tal variedad de receptores sugiere que su efecto no es estrictamente específico. Los anestésicos locales probablemente inhiben diversos neuroreceptores así como los canales iónicos del axón nervioso y del músculo.

Nuestros estudios sobre las características de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a distintas concentraciones de procaína y proprano-

lol (Fig. 20 y Tabla VI) aclaran algunas contradicciones de la literatura. Por ejemplo, la procaína 10  $\mu\text{M}$  produce un incremento en la  $K_d$  pero la  $B_{\text{max}}$  no varía con respecto al control. Con sólo este experimento se podría concluir que la inhibición es de tipo competitivo, como lo describen Fairhurst y col. (191) para la lidocaína y la tetracaína. Sin embargo, con procaína 100  $\mu\text{M}$  hay un mayor incremento en la  $K_d$  y una gran reducción en la  $B_{\text{max}}$ . Esto sugiere que la inhibición es no-competitiva como lo señalan Burgermeister y col. (193). Nuestros resultados están también de acuerdo con los de Feinstein y Paimre (245), quienes encontraron que la tetracaína 10  $\mu\text{M}$  inhibe la respuesta muscarínica del músculo del ileo al carbacol de una forma competitiva. En cambio, a altas concentraciones de tetracaína, la inhibición se presenta como no competitiva. Con procaína 0.1  $\mu\text{M}$  y propranolol 10  $\mu\text{M}$  hay un aumento en la  $B_{\text{max}}$ , lo que sugiere que, a pesar de la afinidad más baja, se descubren nuevos sitios de unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB.

Las representaciones logit-log de la acción de las distintas drogas sobre la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB (Fig. 19) y los números de Hill para las distintas concentraciones de procaína y propranolol (Tabla VI) sugieren que los sitios de unión de los anestésicos locales y de la ( $^3\text{H}$ )-QNB son independientes, puesto que no presentan cooperatividad.

La acción de los anestésicos locales puede ser contrarrestada por el  $\text{Ca}^{2+}$  (169), y se ha postulado que estas drogas desplazan el  $\text{Ca}^{2+}$  unido a las cargas negativas de la membrana. En nuestras condiciones experimentales, se observa que el  $\text{Ca}^{2+}$  produce sólo una ligera disminución de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las



membranas. Este resultado está de acuerdo con el descrito por Aronstam y col. (222), pero difiere del obtenido por Hedlum y Bartfai (246), quienes encuentran un aumento en la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, estos autores utilizan un tampón de incubación distinto, lo que podría explicar las divergencias. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se adiciona a la procaína (Tabla VII), se produce un ligero incremento en la inhibición de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB, lo que está de acuerdo con los resultados previos de Fairhurst y col. (191). En nuestras condiciones experimentales, tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  como el  $\text{Mg}^{2+}$  no tienen ningún efecto significativo sobre la acción de los anestésicos en el receptor muscarínico.

Más relacionados con el mecanismo de acción de los anestésicos locales son los experimentos de protección contra la acción deletérea del Triton X-100. Como hemos mencionado anteriormente, los agentes muscarínicos agonistas y antagonistas, especialmente la atropina, son capaces de proteger el receptor muscarínico de la acción del detergente. El tratamiento de las membranas sinaptosomales con Triton X-100 01-0.2% extrae algunas proteínas (Tabla II), disuelve la membrana presináptica y bloquea irreversiblemente la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB. Si se adiciona atropina 2.5  $\mu\text{M}$  a las membranas antes del tratamiento con el detergente, el receptor muscarínico es protegido (Fig. 17). Estos resultados sugieren que la unión específica de un ligando al receptor impide el cambio irreversible producido por el detergente. Si los anestésicos locales se unieran al receptor, se podría esperar cierto grado de protección contra el efecto del Triton X-100. Los resultados obtenidos, por el contrario, muestran que no hay protección, y que en

Algunos casos, los anestésicos pueden incluso aumentar la inhibición causada por el Triton X-100 (Fig. 21). Estos resultados sugieren que los anestésicos locales se unen probablemente a un sitio accesorio de la membrana y no al sitio receptor propiamente dicho. Por tanto, estas drogas tendrían una interacción de tipo alostérico con el receptor, induciendo una inhibición de la unión específica del ligando.

El estado funcional de la membrana depende de las relaciones mutuas entre sus distintos componentes. En términos generales, las proteínas tienden a producir una inmovilización de los lípidos de la bicapa (246) y, recíprocamente, los lípidos modulan la conformación y el estado funcional de las proteínas (227). Recientemente se ha comprobado que ciertos anestésicos producen una fluidificación de la región interna (hidrofóbica) de las membranas sinaptosomales, sin inducir apenas fluidez en la región superficial de las mismas (247). Este efecto es mayor en las membranas sinaptsomales que en los liposomas formados a partir de los lípidos extraídos de ellas. Por otra parte, la expansión producida por los anestésicos en las membranas celulares es mucho mayor que la que producen en los liposomas (248). Todas estas observaciones sugieren que los anestésicos pueden reducir las interacciones de los lípidos con las zonas hidrofóbicas de las proteínas (247).

La observación de la estructura química de la QNB muestra que, como en el caso de otros antagonistas muscarínicos, tiene una parte esteérica y una parte catiónica similares a la acetilcolina, pero también tiene residuos aromáticos que pueden interactuar con zonas hidrofóbicas del receptor y de sus lípidos aso-

ciados (110,241). También se ha demostrado que el tratamiento de las membranas con fosfolipasa A inactiva el receptor muscarínico (222), lo que sugiere que los lípidos participan en la actividad de este receptor. Parece probable que los anestésicos locales al interactuar con las proteínas y los lípidos de la membrana, pueden modificar las interacciones hidrofóbicas entre los ligandos y el receptor, modificando su afinidad. No obstante, debe considerarse que los anestésicos locales son activos en forma protonada y podrían también alterar las interacciones iónicas entre el receptor y el ligando (191).

En la acción de los anestésicos locales sobre el receptor nicotínico parece que está involucrado el ionóforo o canal iónico asociado. De hecho, la acción de estas drogas es similar a la producida por la dihidrohistriónicotina ( $H_2HTX$ ), que es un bloqueante específico del canal nicotínico (250). Se encontró que la  $H_2HTX$  y la tetracaína tienen un efecto inhibitorio similar sobre la unión de ( $^3H$ )-escopolamina al receptor muscarínico (193). Por otra parte, el metoxiverapamil, que inhibe el flujo de calcio a través de la membrana, también inhibe la unión de ( $^3H$ )-QNB a las membranas del sistema nervioso central (191). Todas estas observaciones sugieren que un posible mecanismo de acción de los anestésicos sobre el receptor muscarínico, es que interactúen con los canales iónicos asociados a este receptor.

La observación de que el propranolol y la fentolamina, a concentraciones que tienen efecto anestésico definido sobre la membrana, inhiben la unión de ( $^3H$ )-QNB, sugiere que deben tenerse ciertas precauciones en las investigaciones sobre la acción

de estas drogas (112). Los ligandos que actúan específicamente sobre los neurorreceptores, en general, ejercen su acción con alta afinidad a bajas concentraciones. La misma droga a altas concentraciones puede actuar como anestésico y producir efectos totalmente diferentes. Por ejemplo, la fentolamina que bloquea los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos con una  $K_i=16$  nM (Tabla I), puede inhibir los receptores muscarínicos pero a una concentración mucho mayor,  $K_i=10$   $\mu$ M (Tabla V).

En resumen, varios hechos observados sugieren que los anestésicos locales pueden actuar sobre sitios de la membrana distintos de los receptores. Los siguientes resultados están a favor de tal interpretación:

- 1) No hay cooperatividad entre los sitios de unión de los anestésicos y los sitios receptores.
- 2) La inhibición causada por los anestésicos sobre los sitios de unión de la ( $^3$ H)-QNB varía con la concentración, pudiendo aparecer competitiva a baja concentración y no-competitiva a altas concentraciones.
- 3) Los anestésicos no protegen los sitios de unión muscarínicos de la inactivación producida por el Triton X-100. También apoya esta interpretación el hecho de que los anestésicos locales pueden inhibir una gran variedad de receptores y canales iónicos.

**VI- CONCLUSIONES**

La presente tesis ha tenido como objetivo el estudio de diversas propiedades de los neuroreceptores centrales. Estos estudios han comprendido la determinación de las propiedades de unión de ligandos a los neuroreceptores de las membranas sinaptosomales, la localización de estos neuroreceptores con respecto a la hendidura sináptica, las alteraciones que en ellos producen ciertos agentes perturbantes de la membrana (como detergentes y anestésicos) y la posibilidad de protegerlos contra la acción de estos agentes mediante la unión de ligandos específicos.

De lo expuesto en los capítulos anteriores se puede extraer las siguientes conclusiones:

A. Especificidad de la unión de ligandos a los neuroreceptores de las membranas sinaptosomales centrales

A1. La ( $^3\text{H}$ )-DHE, antagonista utilizado en el estudio de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, se une específicamente a las membranas sinaptosomales de los ganglios basales del cerebro de gato. La curva de saturación es hiperbólica y alcanza una meseta entre las concentraciones 4 y 6 nM de ( $^3\text{H}$ )-DHE. La representación de Scatchard de la unión específica, una recta única, indica que hay un sólo tipo de sitios de unión para esta droga a las concentraciones empleadas. El coeficiente de Hill es 0.95, lo que sugiere que no hay cooperatividad entre los sitios de unión de esta droga a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos.

A2. La unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE a las membranas de los ganglios basales tiene una  $K_d = 3.7$  nM (intermedia entre corteza cerebral

y cerebelosa), y una  $B_{\max} = 1$  nmol/g de proteínas, que es diez veces superior a la obtenida por otros autores en homogeneizados totales de cerebro. Esto indica que durante la preparación de las membranas sinaptosomales hay un cierto grado de purificación del receptor  $\alpha$ -adrenérgico.

A3. La ( $^3\text{H}$ )-DHE es fuertemente desplazada por agentes  $\alpha$ -adrenérgicos y, en mucho menor grado, por otras drogas. De ello se deduce que la ( $^3\text{H}$ )-DHE se une esencialmente a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en el rango de concentración utilizado en nuestros experimentos.

A4. La unión específica de ( $^3\text{H}$ )-naloxona, utilizada para marcar los receptores opiáceos de las membranas sinaptosomales, alcanza una meseta entre 8 y 10 nM, y una segunda meseta entre 32 y 40 nM. La representación de Scatchard corrobora la presencia de dos sitios distintos de unión (uno de alta y otro de baja afinidad) en las membranas sinaptosomales.

A5. El sitio de alta afinidad de la ( $^3\text{H}$ )-naloxona tiene una  $K_d = 3.7$  nM y una  $B_{\max} = 79$  pmol/g de proteínas. El sitio de baja afinidad tiene  $K_d = 35$  nM y  $B_{\max} = 224$  pmol/g de proteínas. En ambos casos se obtuvo un aumento en el número de sitios receptores en relación al homogeneizado total de cerebro, lo que indica que hay cierta purificación de los receptores opiáceos durante la preparación de las membranas sinaptosomales. Los coeficientes de Hill para ambos sitios son próximos a la unidad, por

tanto, no hay cooperatividad de la unión en ambos sitios receptores.

A6. La unión específica de ( $^3\text{H}$ )-QNB a los receptores muscarínicos de las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de gato, presenta una curva de saturación hiperbólica tanto en las membranas sinaptosomales crudas, como en las purificadas mediante un gradiente de sacarosa. En ambos casos la saturación se alcanza a una concentración de ( $^3\text{H}$ )-QNB entre 0.8 y 1.0 nM. Las representaciones de Scatchard son lineares y los coeficientes de Hill próximos a la unidad para las dos clases de membranas, indicando que sólo hay un tipo de sitios de unión e independientes para la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB.

A7. La unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas sinaptosomales crudas tiene una  $K_d=0.25$  nM, y una  $K_d=0.35$  nM en las membranas purificadas por gradiente de sacarosa. La  $B_{\text{max}}$  en las membranas sinaptosomales purificadas es mucho más alta que en las crudas debido a la mayor concentración de receptores muscarínicos.

B. Efecto de los detergentes sobre la unión específica de los ligandos a los neurorreceptores

B1. Los detergentes modifican enormemente la unión de la ( $^3\text{H}$ )-DHE a las membranas sinaptosomales. El Triton X-100 produce inhibición de la unión específica aun a concentraciones muy bajas. Otros detergentes pueden producir estimulación de la unión cuando se emplean a bajas concentraciones. Las estimulaciones

más altas se alcanzan con deoxicolato y digitonina, ambos a la concentración de  $10^{-4}\%$ . Todos los detergentes utilizados (Triton X-100, Nonidet P-40, deoxicolato y digitonina) inhiben a concentraciones que producen solubilización de la membrana presináptica.

B2. La unión específica de la ( $^3\text{H}$ )-naloxona también es afectada por los detergentes. En general, todos ellos producen inhibición, pero el Nonidet P-40 y la digitonina a la concentración de  $10^{-4}\%$  producen una estimulación de la unión. Como en el caso de la ( $^3\text{H}$ )-DHE, todos los detergentes estudiados producen inhibición de la unión de ( $^3\text{H}$ )-naloxona a concentraciones que disuelven la membrana presináptica.

B3. El Triton X-100 produce una inhibición de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas a concentraciones por encima de  $10^{-3}\%$ . Esta inhibición es total a la concentración de  $10^{-2}\%$ , la cual no disuelve proteínas de la membrana.

B4. Aunque el Triton X-100 produce inhibición de la unión de los ligandos a los distintos receptores, no favorece la disociación de los complejos ligando-receptor, después de que éstos se hayan formado.

C. Localización de los neuroreceptores en las membranas sinaptosomales

C1. El tratamiento de las membranas sinaptosomales con

Triton X-100 0.1-0.2% produce la desintegración de la membrana presináptica y deja intacta la postsináptica, como fue demostrado al microscopio electrónico por De Robertis y col. (172).

C2. El mismo tratamiento cuando se aplica a las membranas sinaptosomales marcadas con drogas radioactivas da lugar a una reducción de la radioactividad específica en el caso de la unión de ( $^3\text{H}$ )-DHE, ( $^3\text{H}$ )-naloxona y ( $^3\text{H}$ )-QNB, las cuales se unen respectivamente a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y muscarínicos. En el caso de la ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC, que se une a los receptores nicotínicos, se produce un incremento de la unión específica después del tratamiento con Triton X-100. Estos resultados sugieren que los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y muscarínicos están localizados pre- y postsinápticamente, mientras que los nicotínicos están localizados fundamentalmente en la membrana postsináptica.

C3. El tratamiento con Triton X-100 0.5%, que disuelve también la membrana postsináptica, produce una reducción de la unión específica de todas las drogas radioactivas utilizadas, incluyendo la ( $^{14}\text{C}$ )-DMTC.

C4. Estos resultados aportan una evidencia bioquímica de la localización presináptica de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, opiáceos y muscarínicos, que había sido propuesta para explicar los mecanismos de retroalimentación en la regulación de la liberación de neurotransmisores.

D. Protección del receptor muscarínico

D1. El tratamiento con Triton X-100 0.01% produce una inhibición reversible de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB a las membranas sinaptosomales, mientras que a concentraciones mayores de 0.1% produce una inhibición irreversible.

D2. El receptor puede ser protegido de la acción deleterea del detergente mediante la preincubación de las membranas con una concentración adecuada de atropina.

D3. Los porcentajes de unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB que se obtienen cuando las membranas protegidas con atropina 2.5  $\mu\text{M}$  son tratadas con concentraciones crecientes de Triton X-100, son muy similares a los recuperados cuando se trata con las mismas concentraciones de detergente las membranas previamente marcadas con ( $^3\text{H}$ )-QNB. De esta forma se confirma la localización pre- y postsináptica de los receptores muscarínicos.

D4. Cuando se preincuba las membranas con atropina 10  $\mu\text{M}$ , después de los lavados queda una inhibición residual de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB. Esta inhibición puede ser parcialmente revertida si se trata las membranas con Triton X-100 0.1-0.2%.

D5. La protección producida por otras drogas colinérgicas no es tan efectiva como la producida por la atropina, pero incluso el ligando nicotínico dimetil-d-tubocurarina produce cierto grado de protección.

E. Efecto de los anestésicos locales sobre el receptor muscarínico

E1. Los receptores muscarínicos centrales pueden ser inhibidos por diversas drogas que producen anestesia local. En esta inhibición la  $K_i$ , se halla en el rango micromolar y no existe cooperatividad entre los sitios de unión de los anestésicos y los de la droga muscarínica ( $^3\text{H}$ )-QNB, como se demuestra por la representación logit-log de las curvas de inhibición y por la representación de Hill de las curvas de saturación de la ( $^3\text{H}$ )-QNB en presencia de anestésico.

E2. La inhibición producida por los anestésicos aparece como competitiva cuando se utilizan a concentraciones próximas a la  $K_i$ , y como no-competitiva cuando éstos se hallan presentes a concentraciones mayores.

E3. Los anestésicos locales pueden alterar tanto la constante de disociación como el número máximo de sitios de unión de la ( $^3\text{H}$ )-QNB.

E4. Los cationes divalentes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  producen una ligera inhibición de la unión de ( $^3\text{H}$ )-QNB y no contrarrestan la inhibición producida por los anestésicos.

E5. La inhibición producida por los anestésicos locales sobre el receptor muscarínico es reversible, puesto que desaparece cuando se elimina el anestésico.

Eó. A diferencia de las drogas colinérgicas, los anestésicos no protegen el receptor muscarínico de la acción deleterea del Triton X-100. Por el contrario, en presencia de algunos de ellos, el detergente produce incluso una inactivación mayor. Esta observación, junto con otros datos de la literatura, sugiere que, en el caso del receptor muscarínico, los anestésicos no interactúan directamente con el sitio receptor donde se fijan los ligandos específicos.

**VII-BIBLIOGRAFIA**

1. Cajal, S.R. (1952): "Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados" C.S.I.C. Instituto Cajal. Madrid.
2. De Robertis, E.D.P. and De Robertis, E.M.F. (1980): "Cell and Molecular Biology" Saunders College. Philadelphia.
3. Raine, C.S. (1976): "Neurocellular Anatomy" en Basic Neurochemistry (Eds. Siegel, G.S., Albers, R.W., Katzman, R. and Agranoff, B.W.). Little Brown. Boston.
4. Morell, P. and Norton, W.P. (1980), *Sci. Am.* 242, 74.
5. Suzuki, K., Norton, W.P. and Tsukada, S. (Chairmen): Myelin-associated enzymes activities (symposium). Abstracts of The Seven Meeting of The International Society for Neurochemistry, pp. 113-144. Jerusalén sep. 1979.
6. Cajal, S.R. (1934), *Trab. Inst. Cajal Invest. Biol.* 24, 1.
7. Pecci Saavedra, J., Vilar, O. y Pellegrino de Iraldi, A. (1979): "Histología Médica". López Libreros. Buenos Aires.
8. De Robertis, E., Pellegrino de Iraldi, A. and Rodríguez de Lores Arnáiz, G. (1961), *Anat. Rec.*, 139, 220.
9. Bloom, F.E. and Aghajanian, G.K. (1966), *Science*, 154, 1575.
10. Peenninger, K., Sandri, C., Akert, K. and Eugster, C.M. (1969), *Brain Res.*, 12, 10.
11. De Robertis, E. and Bennett, M.S. (1955), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 307.
12. Rall, W. and Shepherd, G.M. (1968), *J. Neurophysiol.*, 31, 884.
13. Dowling, J.E. and Boycott, B.B. (1966), *Proc. Roy. Soc. London (Biol.)* 166, 80.
14. Iversen, L.L. (1979), *Sci. Am.* 241, 118.
15. Burnstock, G. (1976), *Neuroscience*, 1, 239.
16. Grafstein, B. (1969), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1, 11.

17. Ochs, S. (1972), *Science*, 176, 252.
18. Droz, B., Koenig, H.L. and Di Giamberardino, L. (1973), *Brain Res.*, 60, 93.
19. Ramírez, G., Levitan, I.B. and Mushyuki, W.E. (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 5382.
20. Gilbert, J.M. (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 6541.
21. Cuenod, M. and Schonbach, J. (1971), *J. Neurochem.*, 18, 809.
22. Schwartz, J.H. (1980), *Sci. Am.*, 242, 122.
23. Ochs, S., (1976) en "Basic Neurochemistry" (Eds. Siegel, G.J., Albers, R.W., Katzman, R. and Agranoff) p. 429. Little Brown. Boston.
24. Di Giamberardino, L., Bennet, G., Koenig, H.L. and Droz, B. (1973), *Brain Res.*, 60, 129.
25. Bennet, G., Di Giamberardino, L., Koenig, H.L. and Droz, L. (1973), *Brain Res.*, 60, 147.
26. Barondes, S.H. (1969), en "Handbook of Neurochemistry". Vol. 2, p.435 (Ed. Lajtha, A.). Plenum Publishing Corp. New York.
27. Fernández, H.L., Burton, P.R. and Samson, F.C. (1971), *J. Cell Biol.*, 51, 176.
28. Paulson, J.C. and McClure, W.O. (1975), *J. Cell Biol.*, 67, 461.
29. Kristensson, K. (1970) *Acta Neuropathol.*, 16, 293.
30. Kristensson, K. (1978), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 18, 97.
31. La Vail, J.M. and La Vail, M.M. (1974), 157, 303.
32. Schwab, M.E. and Thoenen, M. (1976), *Brain Res.*, 105, 213.
33. Levi-Montalcini, R. (1966), *Harvey Lect.*, 60, 219.
34. Paravicini, V., Stöckel, K. and Thoenen, M. (1975), *Brain Res.* 84, 279.

35. Schwab, M.E. (1977), *Brain Res.*, 130, 190.
36. Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1976), *Brain Res.*, 105, 203.
37. Brooks, B.R., Jubelt, B., Swaurz, J.F. and Johnson, R.T. (1979) *Ann. Rev. Neurosci.* 2, 309.
38. Backer, P.F., Hodgkin, A.L. and Shaw, T.I. (1962), *J. Physiol. (London)*, 164, 330.
39. Cowan, W. M. (1979), *Sci. Am.*, 241, 106.
40. Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972), *Science*, 175, 720.
41. Guidotti, G. (1972) *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 731.
42. Tanford, C. (1978), *Science*, 200, 1012.
43. Singer, S.J. (1971): "The Molecular Organization of Biological Membranes" en *The Structure and Function of Biological Membranes* (Ed. Rathfield, L.L.) p. 145. Academic Press. New York.
44. Triggle, D.J. (1971): "Neurotransmitter-Receptor Interaction" p. 122. Academic Press. New York.
45. Norton, W.T. (1976) en "Basic Neurochemistry" (Eds. Siegel, G.J., Albers, R.W., Katzman, R. and Agranoff, B.W.) p. 74. Little Brown. Boston.
46. Lenard, J. and Singer, S.J. (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 56, 1828.
47. Glaser, M., Sinkins, H., Singer, S.J., Sheetz, M. and Chan, S.I. (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 65, 721.
48. Maddy, A.H. (1966), *Int. Rev. Cytol.* 20, 1.
49. Gitel, S.N., Owen, W.G., Jackson, C.M. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70, 1344.
50. Esmon, C.T., Owen, W.G. and Jacson, C.M. (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 7798.

51. Razin, S. and Rottem, S. (1978), *Trens Biochem. Sci.*, 3, 51.
52. Faucon, J.F., Dufourq, J., Lussan, C. and Bernon, R. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 436, 283.
53. Rogers, M.J. and Strittmatter, P. (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 5565.
54. Marchesi, S.L., Steers, E. and Tillack, R.W. (1970), *Biochemistry*, 9, 50.
55. Silman, H.I. and Karlin, A. (1969), *Science*, 164, 1420.
56. De Robertis, E. and Fiszer de Plazas, S. (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, 219, 388.
57. Ochoa, E.L.M. (1978), *FEBS Lett.*, 89, 317.
58. Helenius, A. and Simons, K. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 29.
59. Simons, K., Helenius, A., Leonard, K.D., Sarvas, M. and Gething, L. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 5306.
60. Smith, A.P. and Loh, H.H. (1979), *Life Sci.*, 24, 1.
61. Kelly, P.T. and Cotman, C.W. (1978), *J. Cell Biol.* 79, 173.
62. Gurd, J. W. (1977), *Biochemistry*, 16, 369.
63. Zanetta, J.P., Reeber, A., Vicedom, G. and Gombos, P. (1978), *Brain Res.* 138, 317.
64. Ueda, T. and Greengard, P. (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 5155.
65. Westcott, K.R., La Porte, D.C. and Storm, D.R. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 204.
66. Bartfai, T. (1978), *Trens Biochem. Sci.* 3, 121.
67. Rimon, G., Manki, E., Braun, S. and Levitzki (1978), *Nature*, 276, 394.

68. Knowles, A.F., Kandrach, A., Racker, E. , Khorana, M. G. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 1809.
69. Davis, R.A., Kren, F., Showalter, R., Sutherland, E., Sienensky, M. and Simon, F.R.(1978), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 4130.
70. Raker, E. and Eytan, E. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 7533.
71. Raff, M.C. (1976), *Sci. Am.*, 234,30.
72. Nicolson, G.L. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, 457,57.
73. Folch-Pi, J. and Lees, M.B. (1951), *J. Biol. Chem.*, 191,807.
74. De Robertis, E. (1975): "Synaptic Receptors: Isolation and Molecular Biology". Marcel Deker. New York.
75. Criado, M., Aguilar, J.S. and De Robertis, E. (1980), *Anal. Biochem.*, 103, 289.
76. De Robertis, E., Fiszer de Plazas, S., Llorente de Carlín, M.C., Aguilar, J.S. and Schlieper, P. (1978), *Advances in Pharmacol. and Therap.* (Ed. Jacob, J.), 1, 235. Pergamon Press. Oxford.
77. Racker, E. (1977), *J. Supramol. Struct.*, 6, 215.
78. Capaldi, R.A. and Vanderkooi, G. (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 930.
79. Nicolson, G.L. (1979), *Sci. Am.*, 240, 66.
80. Bretscher, M.S. (1973), *Science*, 181, 622.
81. Van Deenen, L.L.M. (1973), en 24<sup>th</sup> Int. Congress of Pure and Applied Chemistry, 2, 231. Pergamon Elmsford. New York.
82. Yamakawa, T. and Nagai, Y. (1978), *Trens Biochem. Sci.*, 3, 128.

83. Steck, T.L. and Hainfeld, J.F. (1977), International Congress of Cell Biology (Brinkley, B.R. and Porter, K.R. Eds) p 6. The Rockefeller University Press. New York.
84. Steck, T.L., Fairbanks, G. and Wallach, D.F.M. (1971), *Biochemistry*, 10, 2617.
85. Bretcher, M.S. (1971), *J. Mol. Biol.*, 58, 755.
86. Danielli, J.F. and Davson, H. (1935). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 5, 495.
87. Robertson, J.D. (1959), *Biochem. Symp.*, 16, 3.
88. Glaser, M. and Singer, S.J. (1971), *Biochemistry*, 10, 2617.
89. Singer, S.J. (1975): "Architecture and Topography of Biological Membranes" en *Cell Membranes* (Eds. Weissman, G. and Claiborne, R.) p 35. H.P. Publishing. New York.
90. Gitler, C. (1972), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1, 51.
91. Wallach, D. and Zahler, P.M. (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 56, 1552.
92. Vanderkooi, G. and Green, D.E. (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 66, 615.
93. de Kruiff, B., Cullis, P.R. and Verkleij, A.J. (1980), *Trens Biochem. Sci.*, 5, 79.
94. Cullis, P.R. and de Kruiff, B. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 513, 31.
95. Cullis, P.R. and Hope, M.J. (1978), *Nature*, 271, 672.
96. van Dijck, P.W.M., de Kruiff, B., van Deenen, L.L.M., de Gier, J. and Demel, R.A. (1976), *Biochim. Biophys. Acta.* 455, 576.
97. Cullis, P.R., Verkleij, A.J. and Ververgaert, P.M.J. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 513, 11.

98. Branton, D. (1969), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, 209.
99. Branton, D. (1971), *Philos. Trans. R. Soc. London (Biol Sci)* 261, 33.
100. Cullen, M.J. and Gulley, R.L. (1980), *Trens Neurosci*, 3, 113.
101. Gulley, R.L. (1979), *Trens Neurosci.*, 2, 239.
102. Luftig, R.B., Wehrli, E. and McMillan, P.N. (1977).
103. Frie, C.D. and Eididin, M. (1970), *J. Cell Sci.*, 7, 319.
104. Schramm, M., Orly, J., Eimerl, S. and Korner, M. (1977). *Nature*, 268, 310.
105. Nicolson, G.L., Giotta, G., Lotan, R., Neri, A. and Porte, G. (1977), *Modification in Transformed and Malignant Tumor Cell. International Cell Biology* (Eds. Brinkley, B.R. and Porter, K.R.) p. 138. The Rockefeller University Press. New York.
106. Hubbel, W.L. and Mc Connell, H.M. (1971), *J. Am. Chem. Soc.* 93, 314.
107. Deveaux, P. and Mc Connell, H.M. (1971), *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4475.
108. Stevens, C.F. (1979), *Sci. Am.*, 241, 48.
109. Langley, J.N. (1906), *J. Physiol.*, 20, 223.
110. Ariëns, E.J. (1979), *Tens Pharmacol. Sci.*, 1, 11.
111. Bennett, J.P. (1978), en "*Neurotransmitter Receptor Binding* (Eds. Yamamura, H.I., Enna, S.J. and Kuhar, M.J.) p. 57. Raven Press. New York.
112. Williams, M. (1980), *Trens Biochem. Sci.*, 5, 18.
113. Wastock, G.J. and Yamamura, H.I. (1978), *Mol. Pharmacol.* 14, 768.

114. Iversen, L.L., (1978), *Trens Neurosci.*, 1, 15.
115. Weinberg, M.E. and Hall, Z.W. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 504.
116. Eldefrawi, M.E. and Eldefrawi, A.T. (1977), *Acetylcholine Receptors en "Receptor and Recongnition"* (Eds. Cuatrecasas, P. and Greaves, M.F.) 4, 197. Chapman and Hall. London.
117. Ariéns, E.J. and Simonis, A.M. (1976), en  $\beta$ -adrenoceptors blocking agents (Saxena, P.R. and Forsuh, R.P., Eds) p. 3 Elsevier. North-Holland, Amsterdam.
118. Miach, P.J., Dausse, J.-P. and Meyer, P. (1979), en *Presynaptic Receptors* (Eds. Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.*, 18, 213. Pergamon Press. Oxford.
119. De Robertis, E., Alberici, M., Rodríguez de Lores Arnáiz, G. and Azcurra, J.M. (1966), *Life Sci.* 5, 577.
120. De Robertis, E., Azcurra, J.M. and Fiszler, S. (1967), *Brain Res.*, 5, 45.
121. Zimmermann, M. (1979), *Neurosci.*, 4, 1773.
122. Hawthorne, J.N. and Piccard, M.R. (1979), *J. Neurochem.*, 32, 514.
123. Miledi, R., Molinoff, P. and Potter, L.T. (1971), *Nature*, 229, 554.
124. Langer, S.Z. (1977), *Br. J. Pharmacol.*, 60, 481.
125. Langer, S.Z. (1980), *Trens Neurosci.*, 3, 110.
126. Von Euler, V.S. (1979), en *Presynaptic Receptors* (Eds. Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.* 18, 5. Pergamon Press. Oxford.

127. Brawn, G.L. and Gillespie, J.S. (1957), *J. Physiol. (London)*, 138, 81.
128. Paton, W.D.M. and Vizi, E.S. (1969), *Br. J. Pharmacol.*, 35, 10.
129. Wetsfall, T.C. (1977), *Pharmacol. Rev.*, 57, 659.
130. Starke, K., Taube, H.D. and Borowski, C. (1977), *Biochem. Pharmacol.*, 26, 259.
131. Wetsfall, T.C. and Leighton, G. (1976), *Pharmacologist* 18, 208.
132. Michaelson, D.M., Avissar, S., Kloog, Y. and Sokolovski, S. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 6336.
133. O'Dea, R.F. and Zatz, M. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73, 3398.
134. Langer, S.Z. (1974), *Biochem. Pharmacol.*, 23, 1793.
135. Langer, S.Z. (1978), *The release of catecholamines from adrenergic neurons* (Ed. Paton, D.M.) p. 59. Pergamon Press. New York.
136. Starke, K. (1977), *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 77, 1.
137. Filinger, E.J., Langer, S.Z., Perc, C.J. and Stefano, F.J.E. (1978), *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 304, 21.
138. Langer, S.Z. (1979) in *Presynaptic Receptors* (Eds Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.). *Advances in Biosciences*, 18, 15.
139. Farnebo, L.O. and Hamberger, B. (1971), *Acta Physiol. Scan. Suppl.*, 371, 35.
140. Starke, K. and Montel, M. (1973), *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 285, 113.

141. Dismukes, R.K. and Mulder, A.M: (1976), *Eur. J. Pharmacol.*, 39, 383.
142. Starke, K. (1979) en *Presynaptic Receptor* (Eds. Langer, S. Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.*, 18, 129. Pergamon Press. Oxford.
143. Kilbinger, H. (1977), *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 300, 145.
144. Szerb, J.C. and Somogyi, G.T. (1973), *Nature (London) New Biol.*, 241, 121.
145. Szerb, J.C. (1979) en *Presynaptic Receptors* (Eds. Langer, S. Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.*, 18, 129. Pergamon Press. Oxford.
146. Kato, A.C., Collier, B., Ilson, D. and Wright, J.M. (1975), *Can J. Physiol. Pharmacol.*, 53, 1050.
147. Miledi, R., Molenaar, P.C. and Polak, R.L. (1978), *Nature (London)*, 272, 641.
148. Bender, A.N., Ringet, S.P. and Eugel, W.K. (1976), *Neurology*, 26, 477.
149. Farnebo, L.O. and Hamberger, B. (1971) *Acta Physiol. Scand.* 84, 34.
150. Plotsky, P.M., Wightman, R.M., Chey, W. and Adams, R.N. (1977), *Science*, 197, 904.
151. Starke, K., Reimann, W., Zumstein, A. and Hesting, G. (1978) *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 305, 27.
152. Kehr, W. and Debus, G. (1979) en *Presynaptic Receptor* (Eds. Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.*, 18, 199. Pergamon Press. Oxford.

153. Arbilla, S., Kamal, L. and Langer, S.Z. (1979), *Eur. J. Pharmacol.*, 57, 211.
154. Mitchell, P.R. and Martin, J.L. (1978), *Nature*, 274, 904.
155. Montel, M., Starke, K. and Weber, F. (1974), *Naunyn-Smiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 283, 357.
156. Schwart, J.C., Pollard, H., Llorens, C., Malfroy, B., Gros, C., Pradelles, P. and Dray, F. (1978) en *Advances in Biochemical Psychopharmacology* (Eds. Costa, E. and Trabucchi, M.), 18, 245. Raven Press. New York.
157. Mulder, A.H., Werner, J. and de Laugen, C.D.J. (1979) en *Presynaptic Receptors* (Eds. Langer, S.Z., Starke, K., Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.*, 18, 219. Pergamon Press. Oxford.
158. Raiteri, M., Cervoni, A.M., del Carmine, R. and Levi, G. (1979) en *Presynaptic Receptors* (Eds. Langer, S.Z., Starke, K., and Dubocovich, M.L.) en *Adv. in Biosci.*, 18, 225. Pergamon Press. Oxford.
159. Westfall, T.C., Perkins, N.A. and Paul, C. (1979) en *Presynaptic Receptors* (Eds. Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.* 18, 243. Pergamon Press. Oxford.
160. Giorgnief, M.F., Kemel, M.L., Glowinski, K. and Besson, M.S. (1978), *Brain Res.*, 139, 115.
161. Starr, M.S. (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, 48, 325.
162. Campochiaro, P., Schwartz, J.E. and Coyle, J.T. (1977), *Brain Res.* 136, 501.
163. Pollard, H., Llorens-Cortes, C. and Schwartz, J.C. (1977), *Nature*, 268, 745.

164. Schwartz, J.C., De la Baume, S., Llorens, C., Patey, G. and Pollard, M. (1969), en Presynaptic Receptors (Eds., Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) Adv. Biosci., 18, 137. Pergamon Press. Oxford.
165. Nomura, Y., Kajiyama, T., Nakataka, Y. and Segawa, T. (1979), Eur. J. Pharmacol., 58, 125.
166. Hadhazy, P. and Szerb, J.C. (1977), Brain Res., 123, 311.
167. Yamamura, H.I. and Snyder, S.M. (1974), 78, 320.
168. Burt, D.R., Enna, S.J., Cres, I. and Snyder, H.I. (1975), Proc. Natl. Acad. Sci., 72, 4655.
169. U'Prichard, D.C., Greenberg, D.A. and Snyder, S.H. (1977), Mol. Pharmacol., 13, 454.
170. U'Prichard, D.C. and Snyder, S.H. (1979) en Presynaptic Receptors (Eds. Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) Adv. in Biosci., 18, 237.
171. Theleffsnd, P. and Sellin, L.C. (1980), Trens Neurosci., 3, 122.
172. Fiszer, S. and De Robertis, E. (1967), Brain Res., 5, 31.
173. Furchgott, R.F. (1954), J. Pharmac. exp. Ther., 3, 256.
174. Gaddum, J.M. (1962) en "Enzymes and Drug Action". Ciba Foundation Symp. (Eds. Morgan, J.L. and Renk, A.V.S.)p 449. Little Brown. Boston.
175. Tagaki, K. and Takahari, A. (1968), Biochem. Pharmacol., 17, 1609.
176. Ochoa, E.L.M. and De Robertis, E. (1973), Biochim. Biophys. Acta, 895, 528.
177. Seeman, P. (1972), Pharmacol. Rev., 24, 583.

178. Trudell, J.R., Hubbell, W.L. and Cohen, E.N. (1973),  
Biochim. Biophys. Acta, 291, 321.
179. Bangham, A.D. (1975): Models of Cell Membranes, en "Cell  
Membranes" (Eds. Weissman, G. and Claiborne, R.) p. 24.  
H.P. Publishing Co. New York.
180. Lenaz, G., Curatola, G., Mazzanti, L., Bigi, A., Parenti-  
Castelli, G., Sechi, A. and Landi, L. (1977) en Lipid-Pro  
tein Complex (Eds. Peeters, H. and Massné, J.P.) p. 47.  
European Press, Ghent.
181. Lenaz, G., Curatola, G., Mazzanti, L. and Parenti-Castelli,  
G. (1978), Molec. Cell. Biochem., 22, 3.
182. Lenaz, G., Bertoli, E., Curatola, G. and Mazzanti, L.  
en "Membrane ATPase" p. 75. European Press Ghent.
183. Lenaz, G., Curatola, G., Mazzanti, L., Parenti-Castelli,  
G. and Bertoli, E. (1978) Biochem. Pharmac., 27, 2833.
184. Cohen, J.B., Weber, M. and Changeux, J.-P. (1974),  
Mol. Pharmacol., 10, 104.
185. Sobel, A.T., Heidemann, T., Hofler, J. and Changeux, J.-P.  
(1978), Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 510.
186. Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., Albuquerque, E.X., Oli-  
veira, A.C., Mansour, N., Adler, M., Doly, J.W., Brawn,  
G.V., Burgermeister, W. and Witkop, B. (1977), Proc. Natl.  
Acad. Sci., 74, 2172.
187. Krodel, E.K., Beckman, R.A. and Cohen, J.B. (1979),  
Mol. Pharmacol., 15, 294.
188. Lukas, R.J. and Bennett, E.L. (1979) FEBS Lett. 108, 356.
189. Craviso, G.L. and Musacchio, J.M. (1975), Life Sci.,  
17, 1803.

190. Craviso, G.L. and Musacchio, J.M. (1976), *Life Sci.*, 18, 821.
191. Fairhurst, A.S., Whittaker, M.L. and Ehlert, E.J. (1980), *Biochem. Pharmacol.*, 89, 155.
192. Fields, J.Z., Roeske, W.R., Morkin, E. and Yamamura, H.I., *J. Biol. Chem.*, 253, 3251.
193. Burgermeister, W., Klein, W.L., Nirenberg, M. and Wikop, B. (1978), *Mol. Pharmacol.*, 14, 751.
194. Heidmann, T. and Changeux, J.-P. (1978), *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 317.
195. Mattson, M.E. and O'Brian, L. (1976), *J. Neurochem.*, 27, 867.
196. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
197. Dullely, J.R. and Grieve, P.A. (1975), *Anal. Biochem.*, 64, 136.
198. Greenberg, D.A. and Snyder, S.H. (1978), *Mol. Pharmacol.*, 14, 38.
199. U'Prichard, C.D. and Snyder, S.H. (1977), *Life Sci.*, 20, 527.
200. Squires, R.F. and Braestrup, C. (1978), *J. Neurochem.*, 30, 231.
201. Yamamura, H.I. and Snyder, S.H. (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71, 1725.
202. Cohen, R.S., Blomberg, F., Berzins, K. and Siekevitz, P. (1977), *J. Cell Biol.*, 74, 181.
203. Scatchard, G. (1949), *Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A.*, 51, 660.

204. Hill, A.V. (1909), *J. Physiol. London*, 39, 361.
205. Chang, K.-J., Jacobs, S. and Cuatrecasa, P. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, 406, 294.
206. Peroutka, S.J., Greenberg, D.A., U'Prichard, P.C. and Snyder, S.M. (1978), *Mol. Pharmacol.*, 14, 403.
207. Davis, J.N., Srittmatter, E., Hoyler, E. and Lefkowitz, R.J. (1977), *Brain Res.*, 132, 327.
208. Lapetina, E.G., Soto, E.F. and De Robertis, E. (1968), *J. Neurochem.*, 15, 437.
209. Pasternak, G.W. and Snyder, S.H. (1975), *Nature*, 253, 563.
210. Giraudat, J. and Changeux, J.P. (1980), *Trens Pharmacol. Sci.*, 1, 198.
211. Greenlee, D.V. and Olsen, R.V. (1979), *Biochim. Biophys. Res. Com.*, 88, 380.
212. Lang, B., Barnard, E.A., Chang, L.-R. and Dolly, J.O. (1979), *FEBS Lett.*, 101, 149.
213. Ayub Khan Yousufi, M., Thomas, J.W. and Tallman, J.F. (1979), *Life Sci.*, 25, 463.
214. Simon, E.J., Miller, J.M. and Edelman, I. (1975), *Science*, 190, 389.
215. Williams, T.L. and Lefkowitz, R.J. (1978), "Receptor Binding Studies in Adrenergic Pharmacology". Raven Press. New York.
216. Simon, E.J. and Hiller, J.M. (1978), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 18, 371.
217. Guellaen, G., Aggerbeck, M. and Hanoune, J. (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 1076.

218. Beld, A.J. and Ariëns, E.J. (1974), *Eur. J. Pharmacol.*, 25, 203.
219. Aronstam, R.S., Schusser, D.C. and Eldefrawi, M.E. (1978). *Life, Sci.*, 23, 1377.
220. Gavilanes, J., Lizarbe, M.A., Municio, A.M., Ramos, J.A. and Relaño, E. (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 4015.
221. Gennis, R.B. and Jonas, A. (1977), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 6, 195.
222. Aronstam, R.S., Abood, L.G. and Baumgold, J. (1977), *Biochem. Pharmacol.*, 26, 1689.
223. Chang, H.W. and Bock, E. (1979), *Biochemistry*, 18, 172.
224. Marsh, D. and Barrantes, F.J. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 4829.
225. Robinson, N.C. and Tanford, C. (1975) *Biochemistry*, 14, 369.
226. Scrock, H.L. and Gennis, R.B. (1977), *J. Biol. Chem.* 252, 590.
227. Farías, R.N. (1979), *Rev. de Micr. Elect.*, 6, 161.
228. Lenaz, G. Curatola, G. and Masotti, L. (1975), *J. Bioenergetics*, 7, 223.
229. Carson, S., Godwin, J. Massoolie, L. and Kato, G. (1977). *Nature*, 226, 176.
230. Alberts, P. and Bartfai, T. (1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 1543.
231. Rueß, K.-P. and Liefländer, M. (1979), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 88, 627.
232. Kostrzewa, R.M. and Jacobowitz, D.M. (1974), *Pharmacol. Rev.*, 23, 1377.

233. La Motte, C., Pert, C.B. and Snyder, S.H. (1976), *Brain Res.*, 112, 407.
234. Pollard, M., Llorens-Cortes, C. and Swartz, J.C. (1977), *Nature*, 268, 745.
235. Zieglänsterger, W. and Fry, J.P. (1976) en "Opiates and Endogenous Opioid Peptides" (Ed. Kosterlitz, H.W.) p. 231. Elsevier-North Hollan Biomedical Press.
236. Snyder, S.H. and Simantov, R. (1977), *J. Neurochem.*, 28, 13.
237. Reader, T.A., de Champlain, J. and Jasper, H.H. (1976), *Brain Res.*, 111, 95.
238. Reader, T.A., de Champlain, J. and Jasper, H.H. (1979) en *Presynaptic Receptors* (Eds. Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.*, 18, 363. Pergamon Press. Oxford.
239. Kandel, E.R. (1979), *Sci. Am.*, 241, 60.
240. Miach, P.J., Dausse, J.P. and Meyer, P. (1979) en *Presynaptic Receptors* (Eds. Langer, S.Z., Starke, K. and Dubocovich, M.L.) *Adv. in Biosci.*, 18, 213. Pergamon Press. Oxford.
241. Ariëns, R.S. and Simonis, A.M. (1967), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 144, 842.
242. Kloog, Y. and Sokolovsky, M. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 81, 710.
243. Kloog, Y., Egozi, Y. and Sokolovsky, M. (1979), *Mol. Pharmacol.*, 15, 545.
244. Feinstein, M.B. and Paimre, M. (1967), *Nature*, 214, 151.

245. Hedlund, B. and Bartfai, T. (1979), *Mol. Pharmacol.*, 15, 531.
246. Jost, P.C., Griffith, O.H., Capaldi, R.A. and Vanderkooi, G. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 300, 379.
247. Lenaz, G., Curatola, G., Mazzanti, L., Bertoli, E. and Pastuszko, A. (1979), *J. Neurochem.*, 32, 1689.
248. Seeman, P. (1975) en "Cell Membranes" (Eds. Weissman, G. and Claiborne, R.) p. 239. H.P. Publishing. New York.
249. Albuquerque, E.X., Barnard, E.A., Chin, T.H., Lapa, A.J.; Dolly, J.O., Jansson, E.D., Daly, J. and Witkop, B. (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70, 949.

## ABREVIATURAS

(<sup>3</sup>H)-DHE: dihidroergocriptina tritiada.

(<sup>3</sup>H)-QNB: bencilato de quinuclidina tritiado.

(<sup>14</sup>C)-DMTC: dimetil-d-tubocurarina.

Triton X-100 (detergente comercial): eter de polioxietileno.

Nonidet P-40 (detergente comercial): octilfenol nonaoxietileno.

DOC: desoxicolato sódico.

$K_d$ : constante de disociación.

$B_{max}$ : número máximo de sitios de unión.

$N_H$ : coeficiente de Hill.

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a todas las personas e instituciones que de alguna forma han contribuido al desarrollo de este trabajo, especialmente:

Al Dr. Jaime Monreal, Investigador Científico, Jefe de la unidad de Neuribioquímica del Instituto Cajal y director de esta Tesis, por haberme acogido en su laboratorio y orientarme desde un principio en las tareas de la investigación, y por su permanente apoyo y consejo.

Al Profesor Eduardo De Robertis, Director del Instituto de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, quien me inició en las investigaciones sobre neuroreceptores, por sus valiosas sugerencias y colaboración en este trabajo, así como su apoyo humano durante mi estancia en Buenos Aires.

Al Profesor Angel Martín Municio, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, por haber aceptado ser ponente de esta Tesis y por sus valiosas sugerencias durante la preparación de la misma.

Al Instituto Cajal, en la persona de su director Prof. A. Carrato, y al de Biología Celular, por las facilidades y ayudas recibidas de sus miembros.

A mis amigos y compañeros los Drs. M. Criado y E.L.M. Ochoa, por su constante y desinteresada ayuda científica y personal, y a la Dra. M.C. Jiménez Aguilar, por sus orientaciones en la redacción de esta Tesis.

A mis amigos Francisco Carrasco y Miguelina Levi de Stein por su ayuda técnica.

Al C.S.I.C. de España y al CONICET de Argentina, por la ayuda económica prestada mediante una beca de intercambio.

