

Inducción de cooperatividad homotrópica positiva en la unión de antagonistas al receptor colinérgico muscarínico de corteza frontal humana

J.A. Moreno-Yanes*, C. Pascuzzo Lima y R.A. Bonfante-Cabarcas

Laboratorio de Neuroquímica, Sección de Bioquímica, Departamento de Ciencias Funcionales
Decanato de Medicina "Dr. Pablo Acosta Ortiz"

Universidad Centrooccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto-Venezuela

Recibido: 30-05-95 Aceptado: 30-11-95

Resumen

Se estudió la unión de [^3H]-Benzilato de Quinuclidinilo ([^3H]-QNB) y [^3H]-Metilscopolamina ([^3H]-NMS) al Receptor Colinérgico Muscarínico (RCM) de Corteza Frontal Humana (CFH). Cuando las fracciones de CFH fueron preparadas y ensayadas en medios privados parcial o totalmente de cationes (por uso de EGTA, TRIS o resinas de intercambio iónico) la unión corresponde a una cinética de cooperatividad homotrópica positiva (CHP). El efecto de EGTA para inducir CHP dependió del buffer usado. La magnitud de la CHP depende de la concentración de fosfato y también es inducida por HEPES. Cuando la unión de [^3H]-QNB al RCM de CFH fue analizada utilizando fracciones de CFH preparadas y ensayadas en buffer sin extracción catiónica, se caracterizó por mostrar cinética hiperbólica simple. El uso de Borato como sistema buffer para la preparación y ensayo de las fracciones de CFH, induce una cinética homotrópica negativa y/o de heterogeneidad para la unión de [^3H]-QNB a los RCMs. La realización de curvas de saturación para [^3H]-NMS, en condiciones experimentales que garantizan la cinética CHP para [^3H]-QNB mostraron, de acuerdo al análisis de Scatchard, linealidad hasta el 90% de ocupancia con un perfil curvilíneo posterior. Curvas de inhibición realizadas usando concentraciones saturantes de [^3H]-NMS, mostraron que NMS no desplaza al marcador radioactivo con características de inhibidor reversible competitivo simple, obteniéndose coeficientes de Hill (N_H), de 1,35, siendo la K_i de NMS menor que la K_d de [^3H]-NMS. Adicionalmente, curvas de inhibición [^3H]-NMS/QNB mostraron que la K_i de QNB disminuye en función de la concentración de [^3H]-NMS, sugiriendo que también [^3H]-NMS presenta el fenómeno de CHP. El desplazamiento de unión de [^3H]-NMS al RCM de la CFH por el antagonista Pirenzepina fue compatible con 2 sitios (M_1 y M_2) siendo predominantes los sitios de alta afinidad (M_1), atribuyendosele a esta subpoblación la CHP.

Palabras claves: Cooperatividad homotrópica; corteza frontal humana; receptor colinérgico muscarínico.

* Autor para la correspondencia: Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado". Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCHT). Barquisimeto, Venezuela. Teléfono: 518416. Fax: 516087.

Induction of positive homotropic cooperativity in the antagonists binding to cholinergic muscarinic receptor from human frontal cortex

Abstract

We studied the binding of [3 H]-Quinuclidinyl Benzilate ([3 H]-QNB) and [3 H]-Methylscopolamine ([3 H]-NMS) to the Muscarinic Cholinergic Receptor (MCR) from Human Frontal Cortex (HFC). When HFC fractions were prepared and assayed in mediums partially or totally lacking ions (by usage of EGTA, TRIS or cationic interchange resins) the binding was compatible to a Positive Homotropic Cooperativity (PHC). The effect of EGTA depends on the buffer used. The magnitude of PHC depends on phosphate buffer concentration, and is induced by HEPES too. When [3 H]-QNB binding to MCR from HFC was analyzed by using buffers without cationic extraction, the kinetic appears to be simple hyperbola. The use of borate as buffer to prepare and assay HFC fractions, induces a kinetic compatible with Homotropic Negative Cooperativity or Heterogeneity for [3 H]-QNB binding to MCRs. [3 H]-NMS binding curves, in experimental conditions that guaranteed PHC for [3 H]-QNB showed, according to Scatchard analysis, linearity until 90% of occupancy, with a subsequent curvilinear profile. Inhibition curves performed using saturant concentrations of [3 H]-NMS, showed that NMS does not displace the radiolabeled ligand binding as a simple reversible competitive inhibitor, obtaining Hill coefficients (N_{H1}) of 1.35, K_i of NMS was lower than K_d of [3 H]-NMS. Additionally, [3 H]-NMS/QNB inhibition curves showed that K_i of QNB decreases as function of [3 H]-NMS concentration. This also suggests that [3 H]-NMS presents the phenomena of PHC. The displacement of [3 H]-NMS binding to MCR from HFC by Pirenzepine was compatible with 2 sites (M_1 and M_2) being dominant the high affinity population (M_1) making it possible for this receptor population to be responsible for PHC.

Key words: Homotropic cooperativity; human frontal cortex; muscarinic cholinergic receptor.

Introducción

Los Receptores Colinérgicos Muscarínicos (RCM) pertenecen a una superfamilia de proteínas estructuralmente relacionadas que poseen siete regiones transmembrana acopladas a proteínas G (1-3). Se han clonado 5 subtipos de RCM, designados m_1 , m_2 , m_3 , m_4 y m_5 (1,4,5). Se acepta generalmente que la unión de antagonistas al RCM sigue una cinética hiperbólica o acorde al modelo de Michaelis y Menten (6). Los primeros hallazgos indicativos de la heterogeneidad del RCM se basaron en estudios funcionales y de unión usando diversos antagonistas selectivos: pirenzepina, AF-DX-

116, 4-DAMP, y hexahydrosiladifenidol (7). La interacción de estos antagonistas selectivos ha sido interpretada en el contexto de una reacción bimolecular simple que obedecería la ley de acción de masas. Sin embargo, la complejidad de la unión de antagonistas al RCM se hizo mayor al proponerse que diversas clases de drogas interactúan con él a través de la unión a un sitio alostéricamente acoplado al receptor (8). En una de ellas, la galamina, se ha visto la producción de un efecto alostérico bifásico en la unión de [3 H]-QNB al RCM de corazón y cerebro, sugiriendo multiplicidad de sitios para este ligando (9,10). Investigaciones recientes han planteado la posibilidad de que

este sitio pueda estar en un canal de sodio ligado a proteína G (11-13). Mucha de la información referente a la regulación alostérica del RCM se relaciona con efectos cooperativos heterotrópicos (14-16); sin embargo, se ha reportado la aparición de cooperatividad homotrópica positiva como propiedad de la unión de [^3H]-QNB al RCM de corazón de perro (14) y rata (15) bajo condiciones experimentales específicas. Por otra parte, la unión de antagonistas muscarínicos terciarios marcados radioactivamente es bastante diferente de la unión de los cuaternarios (17), considerándose la primera de naturaleza compleja. Estos ligandos presentan cinéticas de asociación y disociación que sugieren interacciones sitio-sitio (18, 19). En este trabajo, se examina el perfil de unión del [^3H]-QNB (ligando terciario) y [^3H]-NMS (ligando cuaternario) al RCM de Corteza Frontal Humana (CFH) en diferentes condiciones. Hallamos que la unión de [^3H]-QNB a las fracciones subcelulares de CFH es compleja y consistente con la propiedad de cooperatividad homotrópica positiva. Este fenómeno se halló marcadamente influenciado por las condiciones iónicas usadas para aislar las fracciones subcelulares o para realizar los ensayos de unión.

Materiales y Métodos

Materiales

L-[^3H]-QNB (L-[^3H]-benzilato de quinclidinilo; 45,4 Ci/mmol) y [^3H]-NMS (L-[^3H]-N-metilescopolamina; 80,4 Ci/mmol) se obtuvieron de NEN (Dupont; Boston, MA). El resto de químicos utilizados provinieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Tejido cerebral

Los especímenes de cerebro humano se obtuvieron del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "Antonio María Pineda", en Barquisimeto. Sólo se tomaron de pacientes de los que no se hubiese reportado enfermedad mental o neu-

rrológica, uso de medicación psicotrópica o consumo de alcohol. El tiempo máximo entre la muerte y la autopsia fue de seis horas. Inmediatamente tras ésta, la corteza frontal fue disecada y almacenada por congelación a -70°C por no más de 2 meses antes de su uso.

Preparación de las membranas

Pequeños trozos de corteza frontal humana (CFH) fueron homogeneizados a 4°C en agua pentadestilada usando un homogeneizador de vidrio con pistilo (450 R.P.M.) y centrifugados a 48.000G por 30 min. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se resuspendió en diferentes buffers para cada tipo de experimento (TRIS, borato, imidazol, HEPES, citrato, y fosfato) con o sin EGTA 1mM, con una nueva centrifugación a 48.000G por 30 min. Este procedimiento se repitió 2 veces y el sedimento resultante fue resuspendido en sacarosa 0,32 M preparada en los Buffers específicos. La fracción nuclear se removió por centrifugación a 1.000G por 10 min y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 48.000G por 60 min. El sedimento resultante se resuspendió en los buffers específicos, siendo centrifugado nuevamente. El último sedimento obtenido se resuspendió en cada buffer específico para dar una concentración de proteína de 2-4 mg/mL determinada por ensayos de ácido bicinquinónico (20) y se refrigeró a -70°C hasta su uso para los ensayos de unión.

Ensayos de unión

Las condiciones experimentales de equilibrio, la no depleción de ligando y la estabilidad de los ensayos, se determinaron antes de los experimentos de saturación y de competición (ver resultados). Para los experimentos de saturación, las membranas (40-80 μg de proteína) se incubaron por cuadruplicado con concentraciones crecientes (5 pM-3 nM) de [^3H]-QNB o [^3H]-NMS. Las incubaciones se realizaron en un volumen de 2 mL de buffer específico, de

concentración determinada y pH 7,3 por 180 min a 37°C. La unión inespecífica se determinó en presencia de 0,1-1 M de atropina y/o por previo calentamiento de las muestras a 60°C por 4 h; este último procedimiento inactiva la unión específica. Los valores de unión inespecífica obtenidos por ambos métodos fueron similares. Estos valores fueron sustraídos de la unión total (ausencia de atropina o de calentamiento a 60°C) para obtener la unión específica. La reacción se terminó por filtración al vacío a través de filtros de fibra de vidrio GF/B (Whatman Paper Ltd.; Brandell, Inc.) usando un cosechador de células modificado para ensayos de unión (Brandell, Inc.), se lavó tres veces con 5 mL de buffer frío, se secó a 60°C por 3 h y se colocaron los filtros en líquido de centelleo (PPO / POPOP / Triton X-100 / tolueno para [³H]-QNB y Optifase II para [³H]-NMS) por 12 h en la oscuridad. La radioactividad se contó en un contador de líquido de centelleo Wallac 1.410 (Pharmacia, Inc., Finland).

Para los ensayos de competición, las membranas (40-80 µg) se incubaron por cuadruplicado con un ligando no marcado (pirenzepina o N-metil-escopolamina) por 3 h y entonces se agregó [³H]-NMS 2 nM, incubándose otra vez por 30 min a 37°C. Los otros pasos y la determinación de la unión específica se llevaron a cabo como fue descrito antes.

Análisis de los datos

Los experimentos de saturación se analizaron usando los métodos de Scatchard (21), Hill (22) y Average Affinity Profile (23) o por regresiones no lineales obtenidas por ajustes computarizados (método de la mínima suma de cuadrados) usando el paquete GraphPad Inplot (I.S.I. Philadelphia, PA.). Los parámetros cinéticos (B_{\max} , K_d) se obtuvieron de la siguiente ecuación:

$$B = \frac{B_{\max} F^n}{(K_d)^n + F^n} \quad [1]$$

usando el programa Ligand (24) adaptado a computadoras IBM (Mc. Pherson, 1983). Los valores de B_{\max} obtenidos se usaron para calcular los parámetros del gráfico de Hill.

Las pendientes de los gráficos de Hill fueron comparadas con la unidad por el uso de la prueba parcial F modificada como sigue: primero, se graficó la unión (*Bound*) contra el logaritmo en base 10 de la concentración del ligando libre ($\log [Free]$) en base a la siguiente ecuación:

$$B = A + \frac{B_{\max} - A}{1 + \left(\frac{10^{K_d}}{10^F}\right)^{N_H}} \quad [2]$$

la suma de cuadrados y grados de libertad se determina por regresión no lineal usando el programa GraphPad Inplot (en esta ecuación, también llamada ecuación logística de cuatro parámetros, el valor de A se fija a 0, puesto que la unión inespecífica se sustrae previamente). En un segundo paso, el número de Hill se fija a 1 y la suma de cuadrados y grados de libertad se determina como antes. El valor de F se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F = \frac{(SS_1 - SS_2) / (df_1 - df_2)}{(SS_2 / df_2)} \quad [3]$$

en la cual el subíndice 1 se refiere al ajuste con menos variables (aquel para el cual se supuso un N_H de 1, es decir un modelo hiperbólico, no cooperativo), SS es la suma de cuadrados de los residuales y df se refiere a los grados de libertad. Para obtener el valor de p , se usó una tabla estadística de valores de F (del programa GraphPad Instat). Se consideró significativamente mejor el ajuste según el modelo de Hill (cinética

cooperativa) cuando el valor de p fuese igual o menor a 0,05.

Resultados

Definición del estado de equilibrio

La determinación de condiciones de equilibrio es ineludible para definir con certeza el fenómeno de cooperatividad homotrópica. La falta de esta condición puede conducir a obtener cinéticas aparentemente hiperbólicas en sistemas cooperativos (26) o pseudocooperativas en sistemas hiperbólicos (27). Para definir el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio, se determinó la unión de [^3H]-QNB a las mem-

branas de corteza frontal humana en función del tiempo. Se usaron concentraciones de [^3H]-QNB de 5 y 10 pM (las menores concentraciones utilizadas en los ensayos de saturación), obteniéndose K_{obs} (constantes de asociación observadas) de 0,0206 y 0,0235/min, respectivamente, correspondiendo a tiempos medios ($t_{1/2}$) de asociación de 29,5 y 33,6 min. Sabiendo que para alcanzar el equilibrio (por lo menos en un 96,9%) se requiere de 5 veces $t_{1/2}$, se evidencia que a los 168 min ya se ha alcanzado éste para la menor concentración mostrada. Puesto que los ensayos se han incubado por espacio de 180 min (3 h), necesariamente la consecución del equilibrio se logra para todos los puntos (Figura 1).

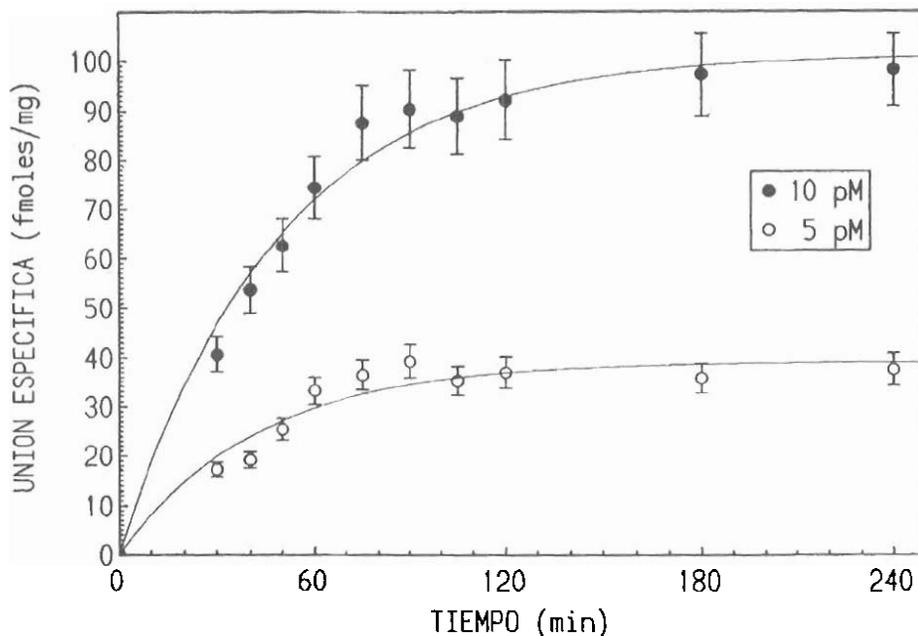


Figura 1. Curso de la asociación de [^3H]-QNB. La concentración final de [^3H]-QNB (de 5 y 10 pM) fue añadida a $25\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de suspensión de membranas de CFH en un volumen total de 2 mL. Los ensayos fueron removidos y filtrados a los tiempos indicados, y los datos correspondientes a la unión inespecífica obtenidos como se indicó en Materiales y Métodos. Los datos son los Promedios \pm Errores Estándar de 4 experimentos independientes. El equilibrio se muestra ya alcanzado a los 180 min. No hay diferencia estadísticamente significativa entre los datos experimentales a 180 y 240 min.

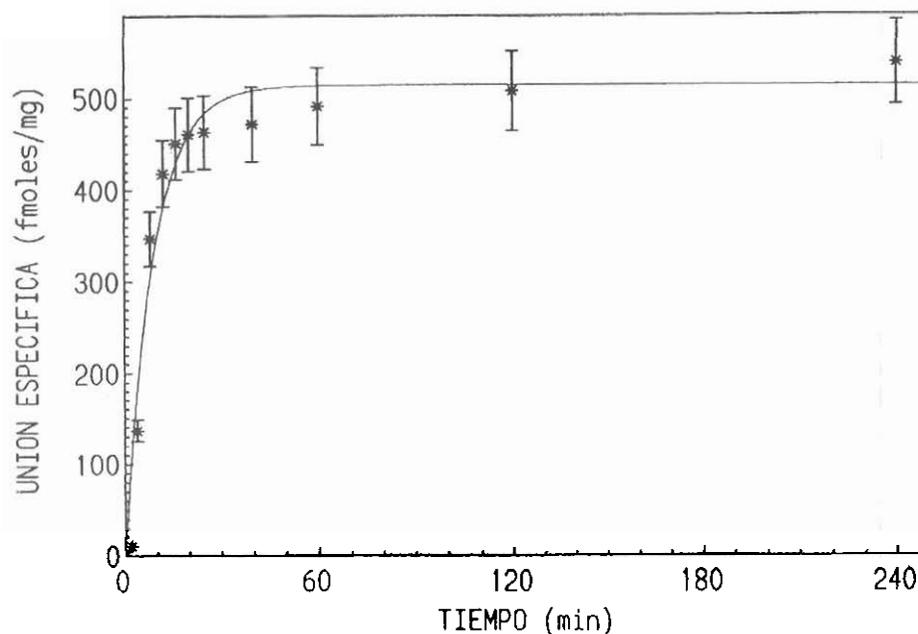


Figura 2. Curso de la asociación de [^3H]-QNB. La concentración final de [^3H]-QNB (de 500 pM) fue añadida a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de suspensión de membranas de CFH en un volumen total de 2 mL. Los ensayos fueron removidos y filtrados a los tiempos indicados, y los datos correspondientes a la unión inespecífica obtenidos como se indicó en Materiales y Métodos. Los datos son los Promedios \pm Errores Estándar de 4 experimentos independientes. El equilibrio se muestra ya alcanzado a los 30 min. No hay diferencia estadísticamente significativa entre los datos experimentales a 30 y 240 min.

Susceptibilidad de la muestra

Dado el prolongado tiempo de incubación a 37°C, se probó la susceptibilidad del RCM en condiciones de baja y total ocupación. En la Figura 1 observamos que, para concentraciones bajas de [^3H]-QNB (5 y 10 pM), la unión es prácticamente invariable desde las 3 hasta las 4 h de incubación a 37°C. En la Figura 2 observamos que para concentraciones de [^3H]-QNB de 500 pM se llega al equilibrio a los 30 min ($K_{\text{obs}} = 0,1145/\text{min}$, $t_{1/2} \cong 6$ min) y la unión es invariable hasta las 4 h, tiempo mayor al empleado en los ensayos. Para confirmar estos resultados, se realizaron incubaciones por espacio de 1, 3, 6 y 12 h con 500 pM de [^3H]-QNB en presencia y ausencia de PMSF 0,1 mM (resultados no mostrados) no

discrepando los resultados con los antes mencionados.

Depleción de ligando

La depleción de ligando es un artefacto que conduce a la falsa interpretación de la cinética, siendo más frecuente al usar altas concentraciones de proteínas para bajas concentraciones de ligando (28, 29). Para descartar la existencia de este fenómeno se determinó la unión de 2,5 pM de [^3H]-QNB (concentración menor a las usadas en los experimentos de saturación) en función de la cantidad de proteínas (Figura 3), observándose que la unión de este ligando es función lineal de la cantidad de proteínas entre 20 y 80 μg . Obviamente, al no existir depleción de ligando para esta concentra-

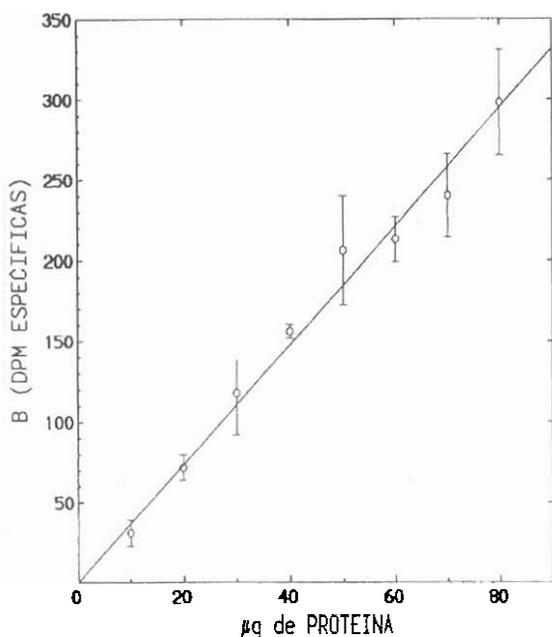


Figura 3. Unión de [³H]-QNB a concentraciones crecientes de suspensión de membranas de CFH 2,5 pM de [³H]-QNB se incubaron contra 10-80 µg de proteína total a 37°C por 180 min. Los datos son los Promedios ± Errores Estándar de 4 determinaciones independientes. La unión de QNB fue lineal como función de la cantidad de proteínas. La actividad específica para cada punto no demostró diferencia significativa ($p > 0.05$) respecto a los demás.

ción de [³H]-QNB, tampoco debe haberla para las superiores a ésta.

Definición de droga libre

En estas condiciones experimentales la relación unido/libre es mayor al 10%, por lo tanto para los análisis gráficos la droga libre debió ser medida con exactitud (28). El cálculo de droga libre se hizo por sustracción a la droga total los valores obtenidos de droga unida. Estos valores teóricos se corroboraron por ensayos paralelos en los cuales la separación de la droga libre se realizó por centrifugación, midiéndose entonces del sobrenadante. Los resultados para el muestreo realizado dan una total correlación ($p > 0.8$) entre ambas determinaciones de droga libre (Tabla 1).

Condiciones experimentales que inducen cooperatividad

En las membranas de corteza frontal se logra inducir el fenómeno de cooperatividad sólo en ciertas condiciones experimentales. En membranas preparadas en buffer Na⁺-fosfato 25 mM EGTA 1mM pH=7.3 y ensayadas en buffer Na⁺-fosfato 25 mM EGTA 0,10 mM pH=7,3 se obtuvo un perfil de saturación compatible con un coeficiente de Hill de $1,784 \pm 0,18$, con valores de B_{max} de 633 ± 13 fmol/mg de proteína, de $Kd = 12 \pm 2$ pM y un perfil de afinidad con valores decrecientes de Kd en función de la

Tabla 1

Promedios ± Errores Estándar de 3 experimentos independientes. La droga libre por filtración fue definida como la diferencia aritmética entre la droga total y la unida en similares condiciones

Método	Droga Total (DPM)	Droga Unida (DPM)	Droga Libre (DPM)
Filtración	1.673 ± 43	534 ± 25	1.139 ± 53
Centrifugación	1.653 ± 52	561 ± 15	1.160 ± 57

Véase que hay una amplia correlación entre las cantidades de droga total, unida y libre determinada por centrifugación o filtración (para más información, ver Materiales y Métodos).

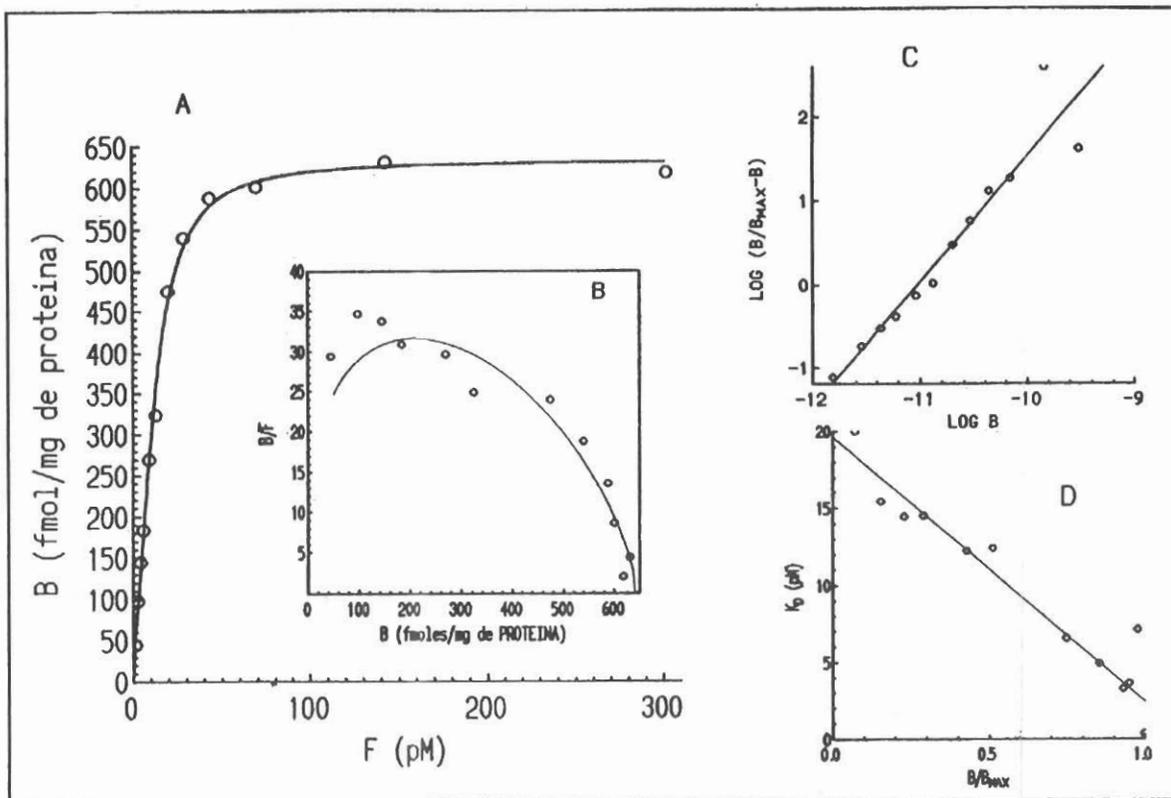


Figura 4. Gráficos de la saturación de fracciones de CFH preparadas en buffer fosfato de sodio 25 mM/EGTA 1mM por [3 H]-QNB, ensayo montado en buffer fosfato de sodio 25 mM/EGTA 0,1mM. **PANEL A:** Las fracciones de CFH (40-60 μ g de proteína) preparadas en buffer fosfato de sodio 25 mM/EGTA 1mM se incubaron con concentraciones crecientes de [3 H]-QNB (2,5-300 pM) por 180 min a 37°C en buffer fosfato de sodio 25 mM/EGTA 0,1mM. La unión inespecífica se obtuvo por uso de atropina 0,1mM o por inactivación de las membranas (ver Materiales y Métodos). Los datos son los Promedios \pm Errores Estándar de 4 determinaciones independientes. **PANEL B:** Análisis de Scatchard de la saturación de CFH por [3 H]-QNB ya descrita. **PANEL C:** Gráfico de Hill de la saturación de CFH por [3 H]-QNB ya descrita y mostrada en el PANEL A. El valor de B_{max} fue calculado de acuerdo a la ecuación 1 (ver Materiales y Métodos). **PANEL D:** Average Affinity Profile de la saturación de CFH por [3 H]-QNB. El valor de Kd para cada ocupancia se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación: $Kd=(B_{max}-B)/(B/F)$. Los parámetros de unión se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2
Condiciones experimentales cooperativas

Buffer Ensayado	B _{max} (fmol/mg)	K _d (pM)	N _H	IIA (K _{d0} /K _{d100})
Fosfato SP-Sephadex	648 ± 15	17 ± 2	1,567 ± 0,16**	4,61
K- fosfato -EGTA 0,1 mM	664 ± 18	22 ± 2	1,461 ± 0,11**	3,44
Fosfato 25 mM-EGTA 0,1 mM	633 ± 13	12 ± 2	1,784 ± 0,18**	8,05
Fosfato 25 mM-EGTA 0,5 mM	784 ± 28	34 ± 6	1,326 ± 0,09**	2,56
Fosfato 25 mM-EGTA.NaCl 25 mM	736 ± 18	12 ± 2	1,463 ± 0,10**	5,44
Fosfato 25 mM-MgCl ₂ 0,1mM	602 ± 15	14 ± 2	1,430 ± 0,13**	4,15
TRIS 25mM- fosfato 1 mM	767 ± 19	45 ± 3	1,306 ± 0,09**	3,34
TRIS 25mM- fosfato 5 mM	760 ± 14	25 ± 1	1,430 ± 0,13**	7,54
TRIS 25mM- fosfato 25 mM	667 ± 24	25 ± 2	1,705 ± 0,23**	11,95
HEPES 25 mM-EGTA 0,1 mM	582 ± 17	22 ± 2	1,417 ± 0,13**	6,11
Borato 25 mM	846 ± 55	271 ± 48	0,690 ± 0,05**	0,23

Parámetros de unión de [³H]-QNB: B_{max}, K_d, número de Hill e Incremento del Índice de Afinidad (IIA) en diferentes condiciones experimentales que inducen cooperatividad. Los valores son los promedios ± Errores Estándar de 4 experimentos independientes, calculados por la ecuación 1 (B_{max} y K_d) (ver Materiales y Métodos) o por regresión no lineal. IIA= K_{d0}/K_{d1}. Estos valores fueron calculados por el gráfico de Average Affinity Profile por regresión lineal, K_{d0} es el valor de X (K_d) cuando Y (índice de ocupancia) es 0, y K_d, es el valor de X cuando Y es 1. Los números de Hill fueron contrastados en su diferencia con la unidad por la prueba parcial F (ver Materiales y Métodos). (*)Diferencia significativa con p < 0,05 y (**) Diferencia significativa con p < 0,01.

ocupancia con una relación K_{d0}/K_{d100} (Índice de Incremento de Afinidad, IIA) = 8,05 (Figura 4 y Tabla 2). Similares resultados fueron obtenidos en membranas ensayadas con buffer K⁺-fosfato 25 mM EGTA 0,10 mM (Tabla 2) y HEPES 25 mM-EGTA 0,10 mM. Ya que este fenómeno se induce en presencia de EGTA, el efecto podía ser dependiente de su propiedad quelante sobre los cationes. Para comprobar esto, se trató el buffer Na⁺-fosfato con una resina de intercambio catiónico SP-Sephadex G-50 (Tabla 2). Este experimento reforzaba la posibilidad de que el fenómeno dependía de la ausencia, al menos parcial, de cationes. Dado que también TRIS es capaz de unir cationes (cobre, zinc) (30), preparamos ensayos de unión de [³H]-QNB a mem-

branas Na⁺-fosfato-EGTA en buffer Na⁺-fosfato 25 mM TRIS 25 mM logrando inducir cooperatividad (Figura 5 y Tabla 2), este efecto parece ser dependiente de la concentración de fosfato (Tabla 2 y Figura 6). Por otra parte los buffers HEPES y Na⁺-fosfato sin EGTA, HEPES-Na⁺-fosfato, TRIS y TRIS-EGTA fueron incapaces de inducir el fenómeno de cooperatividad (Tabla 4).

Establecidas condiciones donde el fenómeno de cooperatividad aparece invariablemente (membranas preparadas en buffer Na⁺-fosfato-EGTA 1mM pH= 7,3 y ensayadas en buffer Na⁺-fosfato-EGTA 0,10 mM pH=7,3) se comprobó el fenómeno en 9 fracciones de corteza frontal humana procedentes de individuos diferentes (Tabla 4), obser-

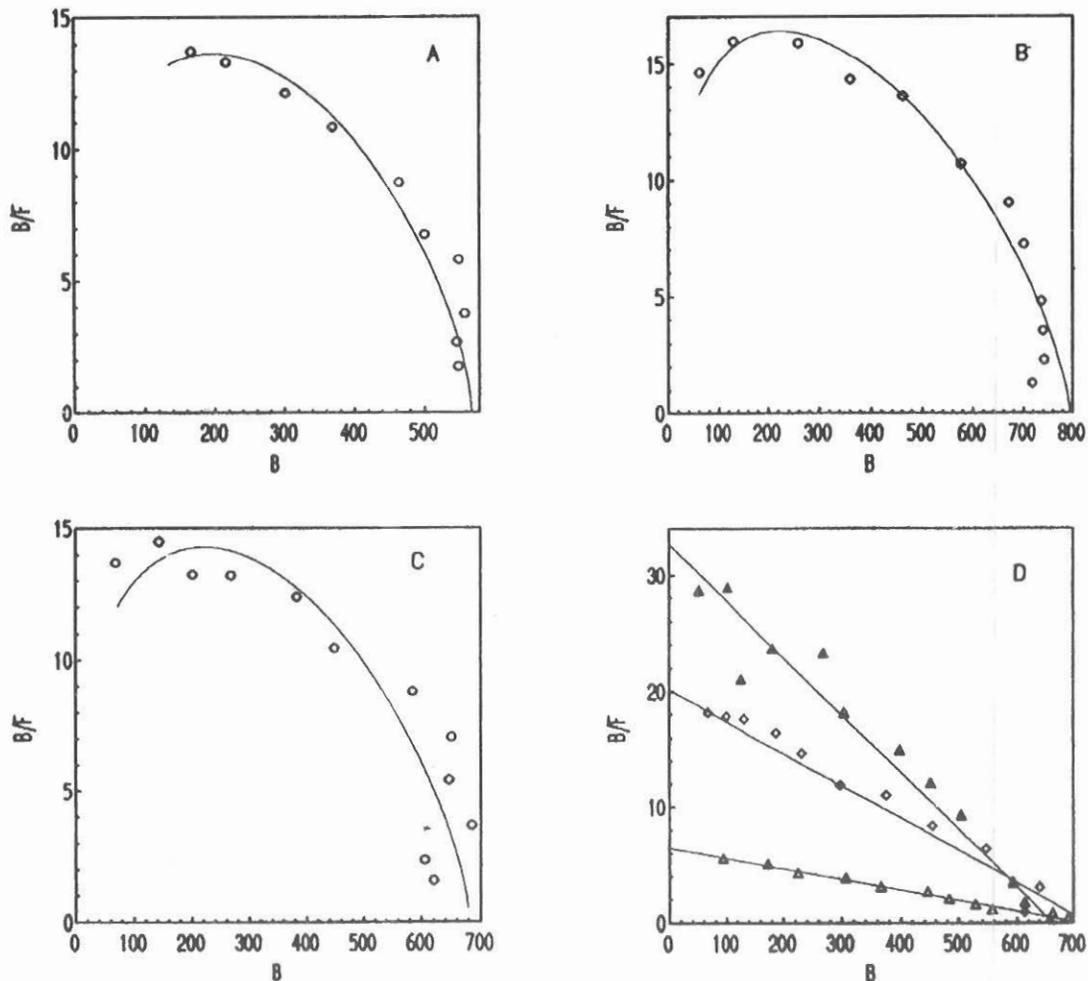


Figura 5. Gráficos de Scatchard de la unión de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ a membranas de CFH en condiciones en las que se induce cooperatividad (PANELES A, B y C) y en las que no se induce ésta (PANEL D). Las fracciones de CFH (40-60 μg de proteína) preparadas se incubaron con concentraciones crecientes de $[^3\text{H}]\text{-QNB}$ (2,5 pM-5nM) en los siguientes buffers: HEPES 25 mM, EGTA 0,1 mM (PANEL A), TRIS 25 mM- FOSFATO 5 mM (PANEL B), TRIS 25 mM- FOSFATO 25 mM (PANEL C), IMIDAZOL 25 mM (PANEL D, triángulos vacíos), CITRATO 25 mM (PANEL D, diamantes vacíos) y FOSFATO 25 mM, EGTA 0,1 mM, MgCl_2 1mM (PANEL D, triángulos llenos). Los datos son los Promedios \pm Errores Estandar de 4 ensayos independientes. Los parámetros de unión se muestran en las Tablas 1 y 2.

vándose en 7 (78%) de ellas el fenómeno de cooperatividad, variando el coeficiente de Hill entre 1,093 y 1,784 con promedio para las muestras con cooperatividad de $1,399 \pm 0,18$. Al estudiar estadísticamente los datos mostrados, se comprobó que el ajuste su-

poniendo cooperatividad era significativamente mejor que un modelo hiperbólico sencillo ($p < 0,05$) para las 7 fracciones de CFH mencionadas. Los valores de B_{max} oscilaron entre 469 y 989 fmol/mg con valor promedio de 688 ± 166 fmol/mg de proteí-

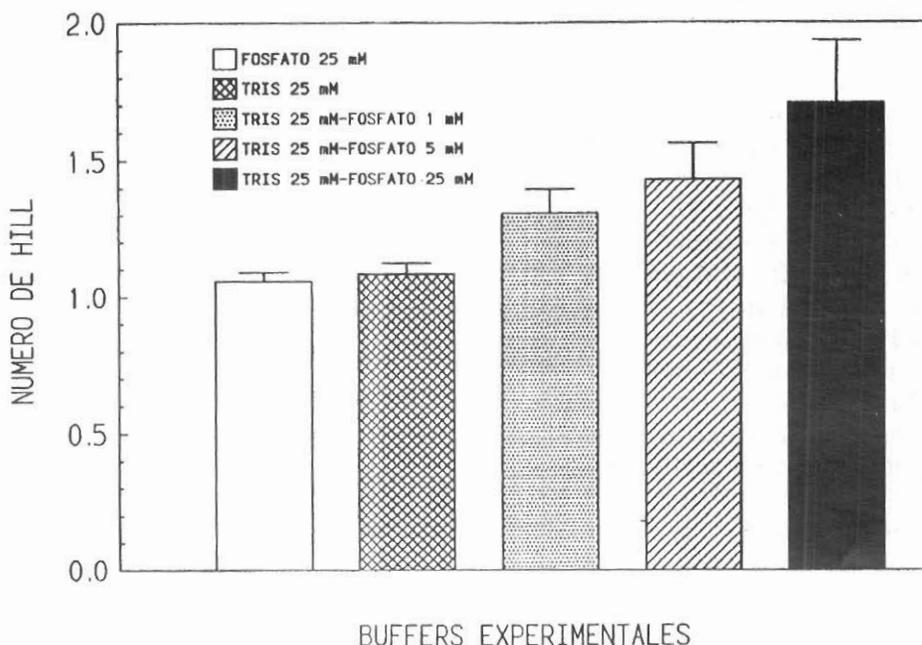


Figura 6. Efectos del fosfato en la unión de [³H]-QNB en buffer TRIS analizados por Gráfico de Hill. Las fracciones de CFH (40-60 µg de proteína) preparadas se incubaron con concentraciones crecientes de [³H]-QNB (2.5-1000 pM) en fosfato 25 mM y en TRIS 25 mM con y sin concentraciones crecientes de fosfato (1, 5 y 25 mM). El valor de B_{max} fue calculado de acuerdo a la ecuación 1 (ver Materiales y Métodos) y los números de Hill se obtuvieron por regresión no lineal. Los datos son los Promedios ± Errores Estándar de 4 saturaciones independientes.

Tabla 3
Parámetros de unión en nueve cortezas frontales humanas

Corteza Ensayada	Edad (Años)	Bmax (fmol/mg)	Kd (pM)	N _H	(Kd ₀ /Kd ₁₀₀)
CFH-1	12	633 ± 13	12 ± 2	1,784 ± 0,18**	8,05
CFH-2	8	989 ± 20	14 ± 1	1,302 ± 0,09**	4,77
CFH-3	Neonato	786 ± 27	19 ± 3	1,093 ± 0,09	1,10
CFH-4	18	746 ± 15	18 ± 2	1,215 ± 0,07**	1,45
CFH-5	4	835 ± 15	18 ± 1	1,343 ± 0,07**	3,28
CFH-6	Neonato	606 ± 15	11 ± 1	1,266 ± 0,13	3,31
CFH-7	12	767 ± 19	45 ± 3	1,306 ± 0,09**	3,80
CFH-8	26	611 ± 11	9 ± 1	1,348 ± 0,15**	4,80
CFH-9	8	513 ± 7	8 ± 1	1,441 ± 0,10**	6,08

Los valores son los promedios ± Errores Estándar de 4 experimentos independientes. Los parámetros cinéticos se determinaron como fue descrito en la leyenda de la Tabla 2 y en Materiales y Métodos. (*) Diferencia significativa con p < 0,05 and (**) Diferencia significativa con p < 0,01.

nas. Los valores de K_d oscilaron entre 8 y 19 pM (promedio de 13 ± 4 pM). Las relaciones K_{d0}/K_{d100} oscilaron entre 1,10 y 6,08 (Tabla 3). Las dos fracciones para las cuales el fenómeno de cooperatividad no se halló o no fue estadísticamente claro provenían de cerebros de recién nacidos. La unión de [3 H]-QNB a membranas preparadas y ensayadas en buffer borato 25 mM pH= 7,2-7,3 no mostró una simple cinética hiperbólica (Figura 7 y Tabla 2); al analizar los datos, se reconoce que éstos pueden ajustarse a una doble hipérbola rectangular, con la posible existencia de 2 sitios de unión con valores de K_d de 46 pM y 1 nM respectivamente y una B_{max} de 732 ± 120 fmol/mg; ésto, sin embargo, también puede interpretarse como cooperatividad negativa, siendo el nH calculado igual a $0,690 \pm 0,05$ (K_d de 271 ± 48 , B_{max} de 846 ± 55). El perfil de afinidad mostró una K_d que aumenta en función de la ocupancia.

Condiciones experimentales que no inducen cooperatividad

La preparación de membranas en buffer Na^+ -fosfato, TRIS, HEPES, citrato e imidazol sin EGTA y ensayada la unión de [3 H]-QNB en los mismos buffers mostraron una cinética hiperbólica simple con valores de K_d variables (Tabla 4 y Figura 5) presentando la unión de [3 H]-QNB alta afinidad en TRIS (15 ± 2 pM) y baja en imidazol (108 ± 25 pM). Por otra parte, la cooperatividad homotrópica inducida por Na^+ -fosfato-EGTA es revertida en presencia de concentraciones iguales o mayores de 50 mM de NaCl, 1mM de $MgCl_2$, 1mM de $CaCl_2$ y 1mM de EGTA (Tabla 4, Figura 5).

Unión de [3 H]-N-metilescopolamina

Para determinar si el fenómeno de cooperatividad es un fenómeno inducido también por radioligandos cuaternarios, estudiamos la unión de [3 H]-NMS a membranas

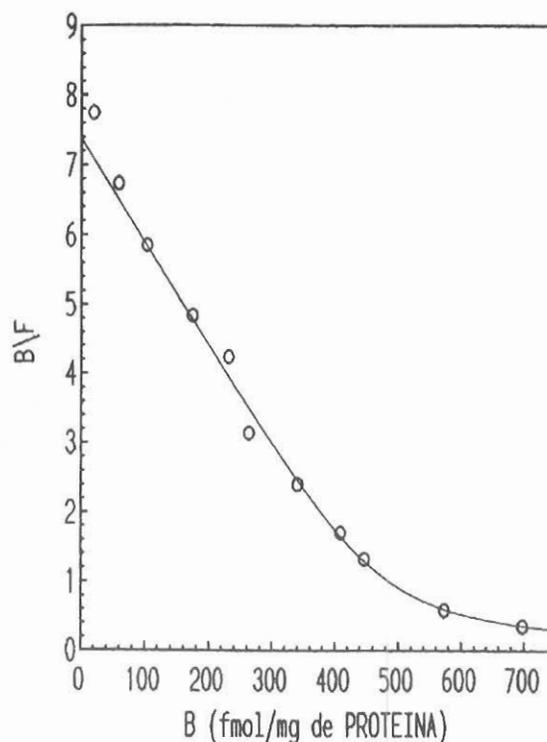


Figura 7. Gráfico de Scatchard de la unión de [3 H]-QNB a membranas de CFH preparada y ensayada en buffer borato. Las fracciones de CFH (40-60 μ g de proteína) preparadas se incubaron con concentraciones crecientes de [3 H]-QNB (92,5 pM to 2 nM) en buffer borato por 180 min a 37°C. El pH fue monitoreado durante toda la incubación, manteniéndose en valores de $7,3 \pm 0,15$. La union inespecífica se obtuvo por uso de atropina 0,1mM o por inactivación de las membranas (ver Materiales y Métodos). Los datos son los Promedios \pm Errores Estándar de 4 determinaciones independientes. La curva obtiene un mejor ajuste asumiendo la presencia de 2 sitios en el receptor (ver Resultados y Tabla 2).

Tabla 4
Condiciones experimentales no cooperativas

Buffer Ensayado	B _{max} (fmol/mg)	Kd (pM)	N _H	IIA (Kd ₀ /Kd ₁₀₀)
Fosfato 25 MM	722 ± 39	63 ± 10	1,059 ± 0,03	3,44
Fosfato 25 MM-EGTA 1 MM	634 ± 45	37 ± 7	1,076 ± 0,05	8,05
Fosfato 25 MM-EGTA-NaCl 50mM	687 ± 63	24 ± 4	1,083 ± 0,08	2,56
Fosfato 25 MM-EGTA-NaCl 100mM	782 ± 66	24 ± 2	1,078 ± 0,04	5,44
Fosfato25 MM-EGTA-MgCl ₂ 0,5 mM	735 ± 48	21 ± 12	1,047 ± 0,06	4,15
Fosfato25 MM-EGTA-MgCl ₂ 1 mM	686 ± 54	20 ± 2	1,036 ± 0,06	3,34
HEPES25 mM	774 ± 45	38 ± 11	1,180 ± 0,08	7,54
HEPES 25 mM-fosfato 25 mM	553 ± 68	56 ± 9	0,970 ± 0,05	11,95
TRIS25 mM	771 ± 98	15 ± 2	1,083 ± 0,03	6,11
TRIS 25 mM -EGTA 0,25 MM	913 ± 57	31 ± 3	1,093 ± 0,04	0,23
Citrato 25 mM	706 ± 36	31 ± 4	1,074 ± 0,04	6,11
Imidazol 25 mM	713 ± 95	108 ± 25	0,998 ± 0,04	0,23

Los valores son los promedios ± Errores Estándar de 4 experimentos independientes. Los parámetros cinéticos se determinaron como fue descrito en la leyenda de la Tabla 2 y en Materiales y Métodos. Los números de Hill no difirieron significativamente de la unidad para ninguna de las condiciones presentadas.

preparadas en buffer Na⁺-fosfato 25 mM EGTA 1mM pH= 7,3 y ensayadas en buffer Na⁺-fosfato 25 mM EGTA 0,25 mM, obteniendo que la cinética de unión es aparentemente hiperbólica para un solo sitio no interaccionante (N_H = 1,11 ± 0,04, p > 0,05) con valores de Kd = 120 ± 7 pM y B_{max} = 744 ± 17 fmol/mg (Figura 8), sin embargo; el análisis detallado del gráfico de Scatchard muestra una linealidad hasta cerca del 90% de ocupancia y un aspecto curvilíneo, con brusca saturación, para ocupancias mayores. Ante la posibilidad de que NMS induzca cooperatividad en concentraciones saturantes, se realizaron curvas de desplazamiento [³H]-NMS vs NMS para una concentración del ligando radioactivo igual a 2 nM (saturante para las condiciones del ensayo). Los resultados obtenidos (Figura 9) mostraron una Ki = 12 ± 2 pM calculada según

Cheng y Prusoff y un N_H = 1,35. En este experimento se obtuvieron dos indicios de cooperatividad: 1) El valor de N_H y 2) Las Ki's de NMS obtenidas en las curvas de desplazamiento, que resultaron 10 veces menores al valor de Kd para [³H]-NMS obtenido en los experimentos de saturación. Para comprobar aún más este hecho realizamos curvas de desplazamiento [³H]-NMS vs QNB con diferentes concentraciones de [³H]-NMS (25, 480, 1.080 y 5.880 pM). Al calcular el valor de la Ki de QNB observamos que disminuyó en función del aumento de concentración del marcador (Figura 10). Estos resultados sugerían que [³H]-NMS genera una interacción sitio-sitio en el RCM permitiendo observar indirectamente cambios de afinidad para los sitios primarios de unión y el fenómeno de cooperatividad. Esto sólo sería evidente para altas concentraciones

nes de [^3H]-NMS. Para definir la subpoblación de receptores responsable del fenómeno de cooperatividad, se realizaron curvas de desplazamiento [^3H]-NMS vs pirenzepina (PZ), obteniendo que la unión de PZ a corteza frontal humana es compatible con la existencia de dos sitios: un 74% con una K_i de $8,63 \times 10^{-8}$ M (M_1) y el 26 % con una $K_i = 5 \times 10^{-6}$ M (M_2) (Figura 10). Este predominio de sitios M_1 sugiere que el fenómeno de cooperatividad hallado pudiera ser inherente a esta subpoblación.

Discusión

La cooperatividad se define de acuerdo a la afinidad receptor-ligando como una función de la ocupancia por este último; dado ésto, se han creado formas gráficas "diagnósticas" de los datos de unión que pueden ayudar a la identificación de interacciones cooperativas. Los más usados son los de Hill (22) y Scatchard (21). En el gráfico de Hill, la unión no cooperativa genera un coeficiente de Hill (N_H) igual a la unidad, en la cooperatividad positiva, este valor se hace mayor de 1 y en la negativa se hace menor (31). En el gráfico de Scatchard, la unión no cooperativa proporciona una línea recta, la unión cooperativa positiva una curva de concavidad hacia abajo y la cooperativa negativa una curva de concavidad hacia arriba (32). Aunque la identificación de cooperatividad positiva por estos gráficos "diagnósticos" es una evidencia aceptable para interacciones cooperativas positivas, no resultan suficientes para comprobar la cooperatividad negativa, la cual, generalmente, se reporta como indistinguible de una heterogeneidad de sitios de unión (33). Menos aceptado pero muy sensible para detectar variaciones de afinidad en función de la ocupancia del receptor por el ligando es el análisis gráfico de De Meyts y Roth (23).

Basados en estos análisis gráficos, en análisis computarizados y pruebas estadísticas realizadas, se demuestra que la

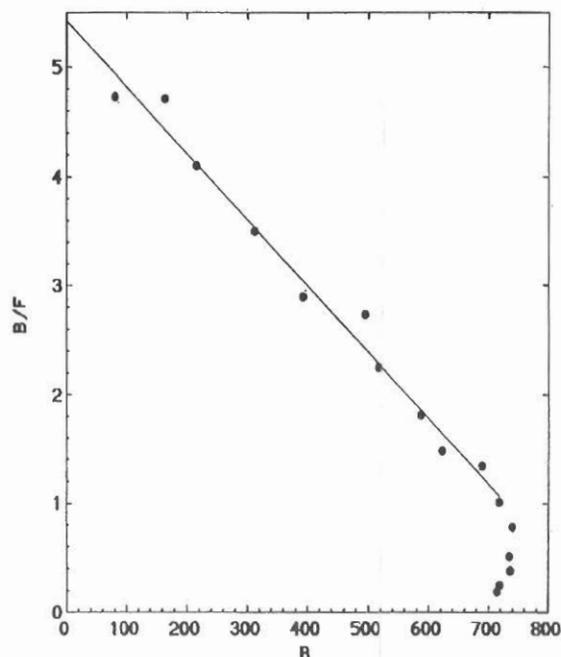


Figura 8. Gráfico de Scatchard de la unión de [^3H]-NMS a membranas de CFH en condiciones que inducen cooperatividad para la unión de [^3H]-QNB. Las fracciones de CFH (40-60 μg de proteína) preparadas se incubaron con concentraciones crecientes de [^3H]-NMS (20 pM to 4 nM) buffer fosfato 25 mM/EGTA 0,1 mM a 37°C por 60 min. Los experimentos se terminaron por filtración como se explicó en Materiales y Métodos. Los datos son los Promedios \pm Errores Estándar de 4 experimentos independientes. Obsérvese que el gráfico de Scatchard es lineal hasta el 90% de ocupancia del RCM por [^3H]-NMS y que, para ocupancias mayores, se torna curvilínea. El análisis de los datos se realizó de acuerdo a lo expuesto en Materiales y Métodos y los parámetros de unión se resumen en Resultados.

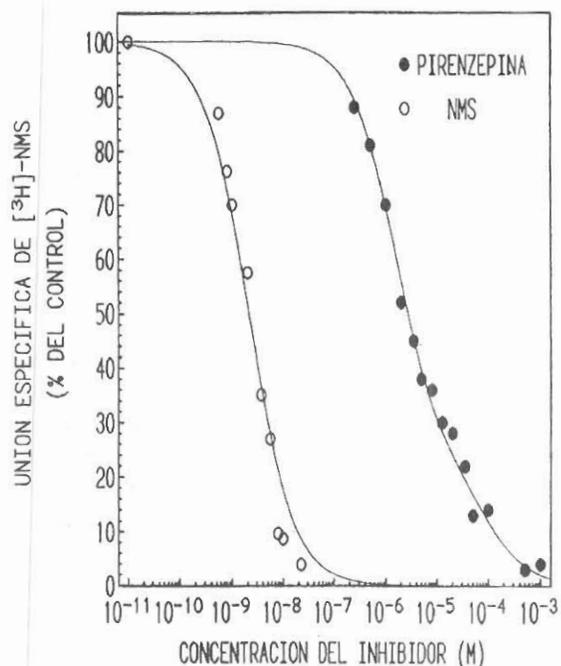


Figura 9. Desplazamiento de la unión de $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ por N-metil-escopolamina o pirenzepina. Las fracciones de CFH (40- μg de proteína) preparadas se incubaron en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de N-metil-escopolamina (10 pM-50 nM) o pirenzepina (0,25 M-1 mM) por 120 min a 37°C y entonces 2 nM de $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ se agregó e incubó nuevamente por 30 min a 37°C. Los datos son los Promedios Errores \pm Estándar de 4 experimentos independientes. Las curvas de competición de pirenzepina son mejor ajustadas asumiendo la presencia de 2 sitios de unión.

cooperatividad homotrópica positiva es un fenómeno propio del RCM de CFH.

En este trabajo se confirmó la presencia de este fenómeno, determinándose parcialmente las condiciones que permiten visualizarlo. Otros autores han reportado la

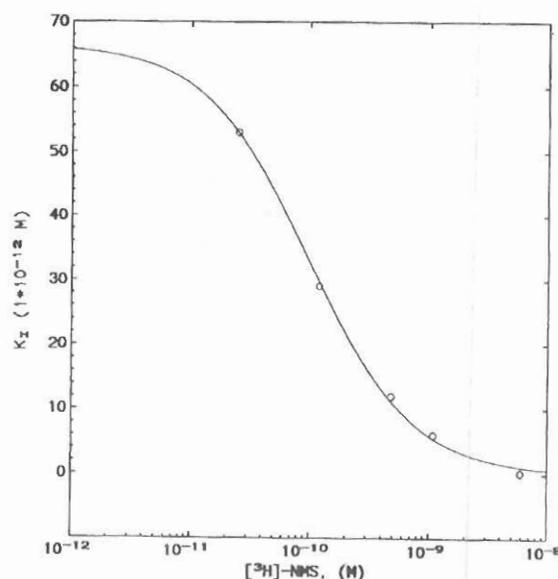


Figura 10. Constante de inhibición del QNB como una función de las concentraciones de $[^3\text{H}]\text{-NMS}$. Las fracciones de CFH (40- μg de proteína) preparadas se incubaron en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de QNB (0,1 pM-0,1 M) a 37°C, por 180 min, después de lo cual, las siguientes concentraciones de $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ fueron agregadas: 25 pM, 120 pM, 480 pM, 1.080 pM y 5.880 pM para cada experimento, incubándose por 60 min. Los datos representados representan las constantes de inhibición de QNB (K_i) para cada concentración de $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ ensayada y fueron calculados de acuerdo a Cheng y Prusoff usando el programa Graphpad Inplot.

presencia de cooperatividad homotrópica positiva como una propiedad inherente a membranas sarcolémicas de corazón altamente purificadas (14,15), sin embargo, estos trabajos han recibido algunas críticas, puesto que podrían haber sido llevados a

cabo en condiciones de depleción de ligando y/o donde el equilibrio para bajas concentraciones de ligando pudiera no haber sido alcanzado (34). En este trabajo se realizaron curvas de asociación con 5 y 10 pM de [^3H]-QNB a 37°C, demostrándose que a las 3 h la reacción está en equilibrio; por otra parte, a pesar del largo tiempo de incubación a 37°C, no se obtuvo desnaturalización experimental del RCM para bajos o altos niveles de ocupancia del receptor por el ligando, demostrando que los resultados no dependen de artefactos relacionados con la desnaturalización proteica. Similarmente, otros autores han usado los mismos tiempos de incubación sin reportar alteraciones en la unión de ligandos al RCM (17,35,36). El segundo requisito a ser llenado es que no exista depleción del ligando en los rangos de concentraciones de [^3H]-QNB usados en las curvas de saturación (28,29). Los resultados obtenidos en la unión de [^3H]-QNB 2,5 pM en función del incremento de proteínas, y la determinación directa de la droga libre permitieron demostrar que no existe depleción de [^3H]-QNB para las concentraciones usadas.

Se han reunido datos experimentales que permiten afirmar que el RCM es regulado alostéricamente (8, 33). Esto implica la posible existencia de sitios primarios de unión del ligando y secundarios alostéricos para la unión de efectores. En el RCM los fenómenos alostéricos han sido puestos de manifiesto por ensayos indirectos: curvas de disociación tipo interacción sitio-sitio y curvas de desplazamiento. La unión directa de antagonistas clásicos tritados en la mayoría de los casos, es compatible con una cinética hiperbólica para sitios de unión no interactuantes (6). En este trabajo la unión de [^3H]-QNB en determinadas condiciones experimentales fue cooperativa, sin embargo, al variar esas condiciones la unión se hace compatible con una cinética hiperbólica simple; además, [^3H]-NMS mostró una unión hiperbólica simple en su unión directa a membranas preparadas y ensayadas en

condiciones que inducen cooperatividad para la unión directa de [^3H]-QNB. Las variaciones observadas podrían ser reflejo de diferentes estados regulatorios del RCM como un todo, y de los diferentes estados de afinidad que pueden adquirir hipotéticos sitios primarios de unión y secundarios alostéricos, por generarse una heterogeneidad capaz de ocultar, parcial o totalmente, el fenómeno cooperativo subyacente.

Los resultados sugieren que estas interacciones se regulan por cationes y grupos fosfato, variando la apariencia gráfica de la cinética según las condiciones experimentales. En este sentido se ha reportado que el RCM puede interactuar con las proteínas G_1 y G_0 en tejido cardíaco, generando una interconversión (mediada por la unión de nucleótidos de guanina) de sitios de alta afinidad en sitios de baja afinidad para agonistas (37-42); se ha logrado, además, demostrar que sólo en ausencia de iones sodio y en presencia de EDTA y Mg^{2+} en concentraciones milimolares, los nucleótidos de guanina inducen la conversión del RCM de estados de baja afinidad a estados de alta afinidad para antagonistas (41,44). Este fenómeno es revertido por concentraciones de Na^+ superiores a 20 mM (44). En similares condiciones, Mattera *et al.* (14) y Boyer *et al.* (15) logran visualizar el fenómeno de cooperatividad homotrópica positiva en la unión de [^3H]-QNB a membranas sarcolémicas de corazón de perros en presencia de Gpp(NH)p, siendo la unión compatible con la existencia de sitios homogéneos no interactuantes en ausencia del nucleótido. Las condiciones experimentales usadas en este trabajo para visualizar el fenómeno de cooperatividad homotrópica positiva por los análisis gráficos clásicos fueron similares a las antes descritas: medio con bajas concentraciones de Na^+ en presencia de EGTA 0,1-0,5 mM; además, aunque la cooperatividad fue visualizada en ausencia de nucleótidos de guanina, lo fue claramente en función de la concentración de fosfato. Este hecho sugeriría que los grupos fosfato mi-

mifican el efecto de Gpp(NH)p en nuestras condiciones, por lo que la unión de nucleótidos de guanina a la proteína G puede relacionarse con dichos grupos. El efecto de EGTA sugiere que la ausencia de cationes puede jugar un papel facilitador en las interacciones sitio-sitio tal vez al regular las afinidades de cada sitio por el ligando, habiéndose involucrado en la regulación de la unión de ligandos al RCM los iones Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Na^+ siendo la unión de agonistas más sensible a esta regulación (33, 34). Puesto que el efecto quelante de TRIS es principalmente sobre Cu^{2+} y Zn^{2+} (30), el hecho de que sea capaz de mimificar el efecto de EGTA, sugiere que Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} o Ni^{2+} (30) tal vez no jueguen un rol central en la interacción sitio-sitio. El efecto de EGTA en la unión de [3H]-QNB depende de la concentración del quelante y del buffer usado. A concentraciones bajas, dependería de su capacidad de retirar cationes del medio iónico. A altas concentraciones podría darse un exceso de este efecto (retirar también un posible pequeño remanente catiónico necesario para visualizar la cooperatividad), producirse un efecto estérico inespecífico, o, como sugieren Potter *et al.* (45) pueden desacoplarse ligandos endógenos regulatorios; cualquiera de estas posibilidades, no excluyentes entre sí, podrían explicar el hecho de que concentraciones de EGTA mayores de 1,0 mM permiten obtener cinéticas hiperbólicas.

HEPES es capaz de inducir el fenómeno de cooperatividad homotrópica. La similitud química de HEPES con ciertos ligandos colinérgicos y la presencia de nitrógenos terciarios en su estructura podrían conllevar a suponer una posible interacción con los sitios secundarios originando la aparición de la cinética.

El buffer imidazol induce un estado aparentemente no cooperativo de baja afinidad para la unión de [3H]-QNB en nuestras condiciones experimentales, que podría ser debido a la acción del imidazol sobre grupos

disulfuros y/o sulfhidrilos dadas las características electrónicas del núcleo imidazol; los cambios en el estado redox de los grupos SH podrían generar cambios en la interacción sitio-sitio conduciendo a la obtención de cinéticas hiperbólicas simples. El efecto de imidazol sobre la unión del ligando al RCM ha sido descrito previamente (46,47).

La cooperatividad es un fenómeno que suele implicar la existencia de un sitio alostérico capaz de interactuar con los sitios primarios de unión. Actualmente, existen claras evidencias de la existencia de sitios alostéricos capaces de unir un gran número de ligandos que interactúan con el RCM de una manera diferente a la simple competencia (8, 33), y que estos sitios pueden encontrarse en la misma proteína (25, 35, 48, 49) o en el mismo complejo proteico. Las interacciones cooperativas entre los sitios primarios de unión y los secundarios alostéricos han sido puestas de manifiesto en experimentos de disociación tipo interacción sitio-sitio (33); siendo sugeridas por experimentos cinéticos de asociación de [3H]-QNB, donde después de una primera etapa de rápido equilibrio seguiría una etapa lenta de isomerización del complejo RCM-[3H]-QNB (18,19) y cinéticas de disociación donde para altas concentraciones de [3H]-QNB, el perfil de disociación es compatible con la alteración de los sitios primarios de unión por la interacción del ligando a un segundo sitio (19). Por otra parte, la afinidad de los sitios de unión se ha reportado dependiente del grado de interacción del RCM con las proteínas G (37-42), con los canales iónicos a través de dichas proteínas (33), del grado de fosforilación del receptor (50) y del estado redox de los grupos sulfhidrilos (34).

Assumiendo lo anterior, puede considerarse que el desacoplamiento del RCM de las proteínas G dejaría libre a los sitios primarios y secundarios a la regulación por cationes y facilitaría la unión de antagonistas. En estas condiciones ambos sitios incrementarían su afinidad hacia el antagonista en función de la ausencia de cationes. Este

incremento sería más intenso en el sitio alostérico, permitiendo que la relación de afinidades entre los sitios primario y secundario sea adecuada para minimizar el efecto de la heterogeneidad, permitiendo que se visualice el fenómeno cooperativo homotrópico positivo inducido por [³H]-QNB al unirse con alta afinidad a dicho sitio. La presencia de cationes disminuiría preferentemente la afinidad del [³H]-QNB por los sitios alostéricos, enmascarando el efecto cooperativo, sin embargo, la alta afinidad de los sitios primarios de unión sería menos o nada afectada. La interacción del RCM con la proteína G, posiblemente originaría cambios conformacionales en el receptor, en estas condiciones la unión de antagonistas estaría desfavorecida, y existiría una tendencia de los sitios primarios y secundarios a disminuir más sensiblemente su afinidad hacia los antagonistas en presencia de efectores negativos (por ejemplo, cationes). La regulación negativa se efectuaría más intensamente sobre los sitios alostéricos, llegando a un extremo donde las afinidades entre los sitios primarios y secundarios difieran tanto que no permiten que su interacción enmascare la heterogeneidad, la cual se haría entonces evidente.

La hipótesis planteada puede explicar los resultados obtenidos en nuestro trabajo, especialmente en lo que respecta a la unión de [³H]-QNB en buffer borato y en la unión de [³H]-NMS. En el primer caso, el ion borato podría competir con sustancias fosforiladas, favoreciendo el acoplamiento RCM-proteína G y por otra parte sería efector negativo preferentemente del sitio alostérico, conllevando a la obtención de cinéticas donde los sitios primarios y secundarios son visualizables como se muestra en la Figura 7. Este mismo fenómeno ha sido observado por nuestro laboratorio en hipocampo humano para concentraciones de Cu²⁺ de 10 μM y en núcleo caudado humano en borato (25 mM) e imidazol (100 mM) (resultados no mostrados). En el segundo caso la naturaleza hidrofílica cuaternaria

conllevaría a que [³H]-NMS interaccionara con baja afinidad con los sitios alostéricos, necesiándose altas concentraciones de [³H]-NMS para poner de manifiesto las interacciones sitio-sitio, tal y como se demuestra en este trabajo y en estudios de interacción sitio-sitio previos, donde se visualizan interacciones cooperativas al usar concentraciones saturantes del radioligando y del efector alostérico (8,9,50).

La cooperatividad parece ser un fenómeno inherente a los receptores M₁, como lo indican las curvas de desplazamiento [³H]-NMS vs PZ que muestran 2 sitios de unión, de los cuales los de mayor afinidad (M₁) predominan, en una relación de 3:1.

En conclusión, las evidencias mostradas sugieren que el RCM de CFH, exhibe el fenómeno de cooperatividad homotrópica positiva; fenómeno que pareciera ser inherente a la población M₁ y ser dependiente del medio iónico.

Financiamiento

Trabajo financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) y por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCHT) de la Universidad Centrooccidental "Lisandro Alvarado", Venezuela.

Abreviaturas

CFH: Corteza Frontal Humana

RCM: Receptor Colinérgico Muscarínico

[³H]-QNB: [³H]-Benzilato de Quinuclidinilo

[³H]-NMS: [³H]-N-Metilescopolamina

NMS: Bromuro de N-Metilescopolamina

PZ: Pirenzepina

PMSF: Fluoruro de Fenil-Metil-Sulfonilo

EGTA: Etilenglicol tetraacético
 EDTA: Etilendiamino tetraacético
 N_H : Coeficiente o número de Hill
 Kd: Constante de Disociación
 Ki: Constante de Inhibición
 B_{max} : Capacidad Máxima de Unión
 Kobs: Constante de Asociación Observada
 IIA: Índice de Incremento de Afinidad
 Gpp(NH)p: 5'-Guanilimidodifosfato

Bibliografía

1. BONNER T.L., BUCKLEY N.J., YOUNG A.C., BRANN M.P.: Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237:527-532, 1987.
2. DOHLMANN H.G., CARON M.G., LEFKOWITZ R.J.: A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26:2658-2664, 1987.
3. VENTER J.C., FRASER C.M., KERLAVAGE A.R., BUCK M.A.: Molecular biology of adrenergic and muscarinic cholinergic receptors. A perspective. *Biochemical Pharmacol* 38:1197-1208, 1989.
4. KUBO T., FUKUDA K., MIKAMI A., MAEDA A., TAKAHASHI H., MISHINA M., HAGA T., HAGA K., ICHIYAMA A., KANGAWA K., KOJIMA M., MATSUO H., HIROSE T., NUMA S.: Cloning, sequencing and expressing of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptors. *Nature* 323:411-416, 1986.
5. PERALTA E.G., ASHKENAZI A., WINSLOW J.W., SMITH D.H., RAMACHANDRAN J., CAPON D.J.: Distinct primary structure, ligand binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J* 6: 3923-3929, 1987.
6. HULME E.C., BIRDSALL N.J.M., BURGEN A.S.V., METHA P.: The binding of antagonists to brain muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 14:737-750, 1978.
7. MITCHELSON F.: Muscarinic receptor differentiation. *Pharmacol Therap* 37:357-423, 1988.
8. LEE N.H., EL-FAKAHANY E.E.: Allosteric antagonists of the muscarinic acetylcholine receptor. *Biochem Pharmacol* 42:199-205, 1991.
9. ELLIS J., SEIDENBERG M.: Gallamine exerts biphasic allosteric effects at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 35:173-176, 1989.
10. ELLIS J., HUYLER J., BRANN M.R.: Allosteric regulation of cloned m₁, m₂ muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 42:1927-1932, 1991.
11. COHEN-ARMON M., HENIS Y.L., KLOOG Y., SOKOLOVSKY M.: Bachatrototoxin changes the properties of the muscarinic receptor in rat brain and heart: Possible interaction(s) between receptors and sodium channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3524-3527, 1985
12. COHEN-ARMON M., SOKOLOVSKY M.: Interactions between the muscarinic receptors sodium channels and guanine nucleotide binding proteins in rat atria. *J Biol Chem* 261:12498-12505, 1986
13. SOKOLOVSKY M., COHEN-ARMON M.: Cross talk between receptors: Muscarinic receptors sodium channels and guanine nucleotide binding protein(s) in rat membranes preparations and synaptoneuroosomes. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 21:11-17, 1988.
14. MATTERA P., PITTS B.J.P., ENTMAN M.L., BIRNBAUMER L.: Guanine nucleotide regulation of mammalian myocardial muscarinic receptor system: Evidence for homo and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted

- curve fitting. *J Biol Chem* 260: 7410-7421, 1985.
15. BOYER J.L., MARTINEZ-CARCAMO M., MONROY-SANCHEZ J.A., POSADAS C., GARCIA-SAINZ J.A.: Guanine nucleotides-induced positive cooperativity in muscarinic cholinergic antagonist binding. *Biochem Biophys Res Commun* 134:172-177, 1986.
 16. TOLLEFSON G.D., SENOGLES S.E., FREYLL W.H.: Ionic regulation of antagonist binding to the human muscarinic cholinergic receptor of caudate nucleus. *J Psychiat Res* 17:275-283, 1983.
 17. LEE N.H., EL-FAKAHANY E.E.: Influence of ligand choice on the apparent binding profile of Gallamine to cardiac muscarinic receptors. Identification of three main types of Gallamine-muscarinic receptors interactions. *J Pharmacol Exper Ther* 246:829-838, 1988.
 18. JARU J., HEDCUND B., BARTFAI T.: Isomerization of muscarinic receptor-antagonist complex. *J Biol Chem* 154:5595-5598, 1979.
 19. SCHIMERLIK M.K., SEARLES R.P.: Ligand interactions with membranes-bound porcine atrial muscarinic receptor(s). *Biochem* 19:3407-3414, 1980.
 20. SMITH P.K., KROHN R.L., HERMANSON G.T., MALLIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOETE N.M., OLSON B.J., KLENK D.C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150:76-85, 1985.
 21. SCATCHARD G.: The alterations of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:660-667, 1949.
 22. HILL A.V.: The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* (London), 40:190-197, 1910.
 23. DE MEYTS P., ROTH J.: Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 66:1118-1126, 1975.
 24. MUNSON P.J., RODBARD D.: Ligand: A versatile computerized approach for the characterization of ligand binding systems. *Anal Biochem* 107:220-239, 1980.
 25. LEE N.H., HU J., EL-FAKAHANY E.E.: Modulation by certain conserved aspartate residues of the allosteric interaction of Gallamine at the m1 muscarinic receptor. *J Pharmacol Exp Therap* 262:312-316, 1992.
 26. DE LEAN A., RODBARD D.: Kinetics of cooperative binding In *Receptors: A Comprehensive Treatise*. Plenum Press. New York (USA), p:143-190.
 27. BENNET J.P., YAMAMURA H.L.: Neurotransmitter hormone and drug receptor binding methods In *Neurotransmitter Receptor Binding* (Yamamura HJ Enna SJ and Kuhar MP Eds.) pp. 61-89. Raven Press. New York (USA), 1985.
 28. WELLS J.W., BIRDSALL N.M.J., BURGEN A.S.V., HULME E.C.: Competitive binding studies with multiple sites effects arising from depletion of the free radioligand. *Biochimica and Biophys Acta* 632:464-469, 1980.
 29. NORMAN A.B., EUBANKS J.H., CREESE I.: Irreversible and quaternary muscarinic antagonists discriminate multiple muscarinic receptor binding sites in rat brain. *J Pharmacol Exp Therap* 248:116-1122, 1989.
 30. DAWSON R.M.C., ELLIOT D.C., ELLIOT W.H., JONES.: *Data For Biochemical Research*. Oxford University Press. Toronto (Canadá), 1986 p. 399-415.
 31. DAHLQUIST F.W.: Cooperativity in ligand binding to proteins showing association-dissociation phenomena: An application of the quantitative interpretation of the Hill coefficient. *Methods Enzymol* 48:270-299, 1978.

32. LEVITZKI A.: Quantitative aspects of allosteric mechanisms In ***Molecular Biology Biochemistry and Biophysics*** (Kleinzeller A., Springer G.F. and Wittmann H.G., Eds.) Vol. 28. Springer-Verlag. Berlin (Alemania), 1978.
33. HENIS Y.L., KLOOG Y., SOKOLOVSKY M.: Allosteric interactions of muscarinic receptors and their regulation by other membrane proteins In ***The Muscarinic Receptors*** (Brown J.H., Eds.) pp. 377-418. The Human Press. New Jersey (USA), 1989.
34. BIRDSALL N.M.J., HULME E.C.: The binding properties of muscarinic receptors In ***The Muscarinic Receptors*** (Brown J.H., Eds.) pp. 31-92. The Humana Press. New Jersey (USA), 1989.
35. STOCKTON J.M., BIRDSALL N.J.M., BURGEN A.S.V., HULME E.C.: Modification of binding properties of muscarinic receptors by gallamine. ***Mol Pharmacol*** 23:551-557, 1983
36. WAELBROECK M., ROBBERECHT P., CHRISTOPHE J.: Muscarinic receptor heterogeneity in rat central nervous system. Binding of four selective antagonists to three muscarinic receptor subclasses: A comparison with m2 cardiac muscarinic receptors of the C tvPe. ***Mol Pharmacol*** 32: 91-99, 1987.
37. BERRIE C.P., BIRDSALL N.J.M., BURGEN A.S.V., HULME E.C.: Guanine nucleotides modulate muscarinic receptor binding in the heart. ***Biochem Biophys Res Commun*** 87:1000- 1006, 1979.
38. WEI J.W., SULAKHE P.V.: Cardiac muscarinic cholinergic receptor sites opposing regulation by divalent cations and guanine nucleotides. ***Eur J Pharmacol*** 62:345-349, 1980.
39. EHLERT F.J., ROESKE W.R., YAMAMURA H.L.: Muscarinic receptor regulation by guanine nucleotide ions and N-ethyl-maleimide. ***Fed Proc*** 40:153-161, 1981.
40. BURGESSER E., DE LEAN A., LEFKOWITZ R.J.: Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding to muscarinic cholinergic receptor by guanine nucleotides. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 79:1732-1737, 1982.
41. WAELBROECK M., ROBBERECHT P., CHATELAIN P., CHRISTOPHER J.: Rat cardiac muscarinic receptors. I. Effects of guanine nucleotides on high and low affinity binding sites. ***Mol Pharmacol*** 21:581-588, 1982.
42. HULME E.C., BERRIE C.P., BIRDSALL N.J.M., BURGEN A.S.V.: Two populations of binding sites for muscarinic antagonists in the rat heart. ***Eur J Pharmacol*** 73:137-142, 1981.
43. HORSEY M.M.: Regulation of antagonist binding to cardiac muscarinic receptor. ***Biochem Biophys Res Commun*** 107:314-321, 1982.
44. POTTER L.T., FLYNN D. D, HANCHETT H. L., KALINOSKI D.L., LUBER-NADOR J., MASH D.C.: Independent M and M2 receptors: ligands autoradiography and functions. ***Trends Pharmacol Sci*** 5 (sup): 22-31, 1984.
45. SULAKHE P.V., JAGADEESH G., PHAN N.T., RAO T.S., VEERANJANEYULU A.: MgCl₂-sensitive and Gpp(NH)p-sensitive antagonist binding states of rat heart muscarinic receptor: preferential detection at ambient temperature assay and location in two subcellular fractions. ***Mol Cell Biochem*** 94:133-146, 1990.
46. SULAKHE P.V., JAGADEESH G., PHAN N.T.: Divalent cation-sensitive antagonist binding to heart muscarinic receptors. ***Gen Pharmac*** 22:375-379, 1979.
47. POTTER L.T., MARTIN J.M., HANCHETT H.E., HOLLIFIELD M.A., LORENZI M.V.: Tetrahydroaminoacridine and other allosteric antagonist of hippocampal M1 muscarinic receptors. ***Mol Pharmacol*** 35:652-660, 1989.

48. HEDCUND B., GRYNFARB M., BARTFAI T.: Two ligands may bind simultaneously to the muscarinic receptors. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 320:3-13, 1982.
49. BURGOYNE R.D.: Regulation of the muscarinic acetylcholine receptors: Effects of phosphorylating conditions on agonist and antagonist binding. *J Neurochem* 40:324-331, 1983.
50. LEE N.H., EL-FAKAHANY E.E.: Allosteric interactions at m² and m³ muscarinic receptors subtypes. *Pharmacol Exp Therap* 256:468-479, 1990.