

MODULACIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO POR MOLÉCULAS DE RELEVANCIA CLÍNICA

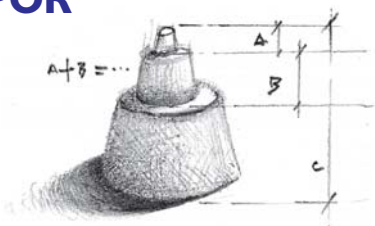
Armando Alberola-Die*, Sergi Soriano, Isabel Ivorra y Andrés Morales

Div. Fisiología. Dpto. de Fisiología, Genética y Microbiología.

Universidad de Alicante, E-03080 Alicante, España.

* Autor para remitir correspondencia: Dr. Armando Alberola Die. E-mail: alberoladie.armando@ua.es

Teléfono: 0034 96-590.3400 Ext. 2876



El receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) es el miembro mejor caracterizado de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (LGICs). Las disfunciones del nAChR se han relacionado con graves alteraciones fisiopatológicas del sistema nervioso, así como con alteraciones inflamatorias e inmunológicas y con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Por ello, el conocimiento de las moléculas que modulan la función de este receptor, el estudio de sus mecanismos de acción y la dilucidación de sus lugares de unión son de gran interés científico, ya que son pasos fundamentales para avanzar en el desarrollo de nuevas moléculas de aplicación terapéutica, dirigidas al tratamiento de las patologías mencionadas. Esta revisión pretende describir los principales mecanismos de modulación del nAChR y exponer los efectos que diversas moléculas de interés clínico ejercen sobre el nAChR, algunas inhibiendo su actividad y otras potenciándola.

Estructura y función del nAChR

El nAChR es una proteína transmembrana pentamérica, que pertenece a la superfamilia de receptores iónicos activados por ligando. Se localiza en distintas zonas del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), músculo y otros tejidos no excitables, incluyendo tejido linfoide, endotelio vascular, células cutáneas y adipocitos (Gotti y Clementi, 2004). Las subunidades que constituyen el nAChR presentan cuatro segmentos transmembrana (M1-M4) que forman un poro iónico selectivo a cationes, limitado por los segmentos M2 de cada subunidad (Figura 1A₁ y A₂). El nAChR se activa por la unión del agonista a lugares específicos localizados en dominios extracelulares (Unwin, 2005), lo que resulta en un cambio conformacional que lleva al canal de un estado cerrado a otro abierto, permitiendo el flujo de iones y generando corrientes iónicas a través de la membrana (Figura 1B). Aparte de los estados abierto y cerrado, el nAChR puede adoptar varios estados desensibilizados, en los cuales el nAChR presenta una mayor afinidad por el agonista pero no permite el flujo de iones a su través (Giniatullin y cols., 2005).

Los nAChRs presentan una gran diversidad estructural, definida por la variedad de subunidades que los conforman y su estequiometría, lo que determina sus propiedades funcionales y farmacológicas. El prototipo de estos receptores es el presente en la unión neuromuscular de vertebrados y en los electrocitos de algunos peces eléctricos (nAChRm), que está constituido por dos subunidades α_1 (que presentan los lugares de unión al ligando) asociadas a una subunidad β_1 , δ y ϵ (en el adulto) o γ (en periodo fetal o en músculo denervado) (Figura 1A₁ y C). En el sistema nervioso de vertebrados existe una amplia heterogeneidad de nAChRs, llamados genéricamente nAChRs neuronales (nAChRn), que se diferencian atendiendo a su afinidad por agonistas y por α -bungarotoxina (Albuquerque y cols., 2009). Los nAChRns se pueden clasificar en: i) heteroméricos, formados por la asociación de dos subunidades α_2 , α_3 , α_4 , α_5 o α_6 y tres subunidades β_2 , β_3 o β_4 (Figura 1C), siendo los $\alpha_4\beta_2$ y $\alpha_3\beta_4$ los más abundantes del SNC y SNP, respectivamente; ii) homoméricos, formados por la asociación de cinco subunidades α_7 , α_8 o α_9 , siendo los α_7 los más comunes (Figura 1C).

Dada su relevancia funcional, los nAChRs constituyen una de las dianas terapéuticas más relevantes, ya que están implicados en el origen o desarrollo de diversos procesos fisiopatológicos de gran prevalencia, incluyendo, entre otros, la adicción a la nicotina, ciertos tipos de miastenia, esquizofrenia, alteraciones cognitivas, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson, alteraciones inflamatorias e inmunológicas y algunos tipos de cáncer (Gotti y Clementi, 2004; Ashcroft, 2006; Hurst y cols., 2012). Por tanto, los estudios dirigidos a la caracterización de los lugares de

modulación de estos receptores son clave para el desarrollo de nuevos fármacos que potencien o, en su caso, inhiban la función de subtipos específicos (Arias, 2010).

Mecanismos de modulación del nAChR

Las moléculas que modulan el nAChR pueden unirse a esta proteína en muy distintas regiones (Figura 2A) y mediar sus efectos por distintos mecanismos:

i) Algunas moléculas actúan uniéndose en el interior del canal, cuando éste se encuentra abierto, lo que impide el paso de iones a su través (Figura 2A, esfera amarilla). Este tipo de bloqueo, conocido como “de canal abierto” es de tipo estérico, no competitivo, y no es estático, ya que las moléculas inhibitorias se unen a su lugar específico y se disocian continuamente (*flickering*), generándose un equilibrio entre las especies unidas y las libres (Neher y Steinbach, 1978). Este mecanismo de bloqueo se observa principalmente, pero no exclusivamente, con moléculas cargadas y su efecto es dependiente del potencial de membrana celular.

ii) Otras moléculas presentan afinidad por el lugar ortostérico (zona de fijación del ligando), por lo que compiten o interfieren con el agonista en su unión al receptor. Estas moléculas, que pueden ser agonistas, actúan como inhibidores competitivos clásicos (Figura 2A, pentágonos verdes).

iii) Hay moléculas que no bloquean estéricamente la luz del canal, ni actúan en la región ortostérica y, genéricamente, se denominan moduladores alostéricos, que pueden ser de carácter positivo (MAP) o negativo (MAN), según aumenten o disminuyan la actividad del nAChR, respectivamente. Estos moduladores alostéricos pueden actuar en distintas regiones del nAChR, pues la unión de una molécula a cualquier lugar del nAChR puede modificar su estabilidad en una conformación y/o las barreras energéticas para cambios conformacionales (Hogg y cols., 2005; Bertrand y Gopalakrishnan, 2007). Entre los moduladores alostéricos se incluyen: a) moléculas que actúan a nivel extracelular, cuando los canales se encuentran en estado cerrado, generando un cambio conformacional que puede dificultar o facilitar/estabilizar su apertura (Arias, 2010; Figura 2A, estrellas rosas) y/o modificar el grado de desensibilización (Giniatullin y cols., 2005; Yakel, 2013; Figura 2A, rectángulo rojo); b) una gran variedad de moléculas hidrófobas, que pueden difundir al interior de la membrana e interactuar con lugares situados en la interfase proteína-lípidos (Hogberg y cols., 2007; Figura 2A, triángulos rojos) y c) algunos ligandos que interactúan con residuos del interior del canal que, aparte del bloqueo estérico, pueden evocar un aumento en la desensibilización (Figuras 2A, rectángulos naranjas), lo que reduce el número de nAChRs susceptibles de ser abiertos por el agonista

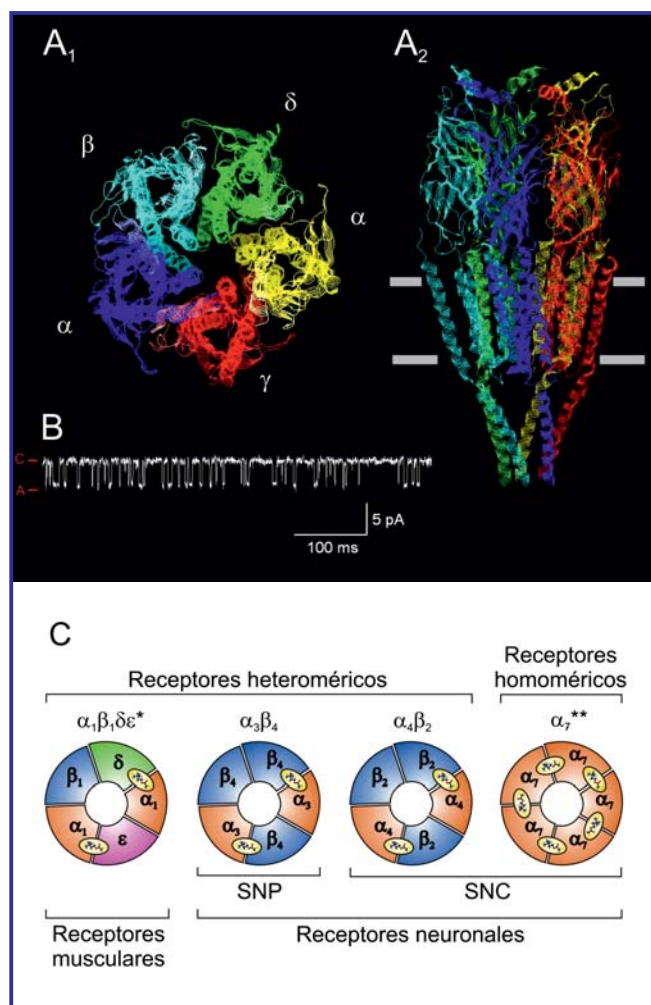


Figura 1. Estructura del nAChR de la electroplaca de *Torpedo marmorata* y heterogeneidad de nAChRs en base a las subunidades que los componen. (A₁ y A₂) Modelo del nAChRm generado a partir de la estructura de la proteína depositada por Nigel Unwin en el Protein Data Bank (ID: 2BG9). (A₁) Imagen del nAChRm en un plano perpendicular a la membrana, visto desde el lado extracelular. Se observa la disposición de las cinco subunidades que forman un canal iónico central. (A₂) Perspectiva del nAChRm paralela al plano de la membrana. Obsérvese cómo la región extracelular, que contiene las zonas de unión del ligando, es muy prominente y que cada subunidad presenta 4 segmentos transmembrana en forma de hélices α . Las líneas horizontales representan el espesor de la bicapa lipídica. (B) Registro obtenido con la técnica de parche de membrana de un nAChR de electroplaca de *Torpedo* reconstituido en un proteoliposoma gigante (registro no publicado de los autores). Los cambios de nivel indican las corrientes unitarias cuando el canal pasa del estado cerrado (C) al abierto (A), por efecto del agonista. (C) Las diferentes subunidades de los nAChRs forman múltiples oligómeros, que se localizan de forma diferencial en el sistema nervioso y los músculos. Los óvalos amarillos representan el lugar de unión del agonista. (*) La subunidad ϵ se sustituye por la γ presente en el músculo denervado o embrionario. (**) Los receptores homoméricos del SNC pueden estar constituidos por 5 subunidades α_3 o α_5 .

(Ochoa y cols., 1989; Arias, 2010).

iv) Por último, algunas moléculas modifican la cinética de la desensibilización mediante un efecto indirecto, muchas veces mediado por la formación de segundos mensajeros, que causan la fosforilación de residuos intracelulares del nAChR (Ochoa y cols., 1989; Figuras 2A, rectángulos azules).

El acceso de los ligandos a los distintos lugares de modulación que presenta el nAChR puede efectuarse mediante 2 vías: la hidrofílica y la hidrofóbica (Figura 2B). Mediante la vía hidrofílica (Figura 2B, azul), los moduladores pueden interactuar con residuos expuestos en el lado extracelular y en la luz del canal. Mediante la vía hidrofóbica (Figura 2B, rojo), las moléculas interactúan con aminoácidos que forman parte de los segmentos transmembrana, penetrando desde la bicapa lipídica. Estas 2 vías no son excluyentes para una determinada molécula, porque depende de si ésta puede adoptar en el medio más de una conformación

molecular (por ejemplo, cargada y neutra). Así, lo normal es que incluso las moléculas más simples modulen la función del nAChR por distintos mecanismos, uniéndose en diferentes puntos de la proteína.

Modulación negativa del nAChR

Entre los MANs del nAChR mejor estudiados se incluyen los anestésicos locales (ALs), que se utilizan rutinariamente en la práctica médica por inhibir reversiblemente los potenciales de acción que se propagan por fibras nerviosas y actuar como antiarrítmicos cardíacos. En general, los ALs son aminas aromáticas anfífilas, en las que un enlace éster o amida separa las porciones hidrofílica e hidrofóbica. Sin embargo, en los estudios de modulación del nAChR se han utilizado preferentemente análogos moleculares con grupos amonio-cuaternario, es decir, permanentemente cargados, tales como QX-222 o QX-314. Estas moléculas, similares a la lidocaína, causan un bloqueo a canal abierto del nAChR, uniéndose en el interior del canal y ocluyéndolo físicamente (Neher y Steinbach, 1978; Horn y Brodwick, 1980). Este mecanismo de inhibición lo ejercen también otros anestésicos locales con grupos amino-terciario en su estructura molecular, como la procaína (Adams, 1977), la tetracaína (Koblin y Lester, 1979) o la lidocaína (Alberola-Die y cols., 2011 y 2013). Este efecto se debe, posiblemente, a que un elevado porcentaje (>83%) de sus moléculas están protonadas a pH 7, por lo que, a ese pH, se comportarían como moléculas con grupos amonio-cuaternario. Un mecanismo similar de inhibición se observa con otras moléculas con grupos amonio-cuaternario, incluyendo anticolinesterásicos como el edrofonio (de uso clínico), o el BW284c51 (Olivera-Bravo y cols., 2005, 2007).

Los ALs con grupos amonio-cuaternario, además de actuar como bloqueantes no competitivos del nAChR, al “taponar” el poro iónico, incrementan la desensibilización del nAChR (Sine y Taylor, 1982; Neher, 1983). Un efecto similar se ha descrito para la lidocaína (y otros ALs de estructura similar), que incrementa la desensibilización de los nAChRms (Steinbach, 1968; Anwyl y Narahashi, 1980; Alberola-Die y cols., 2011) y nAChRns, al menos aquellos subtipos expresados en ganglios vegetativos (Alberola-Die y cols., 2013). Cabe destacar que algunos anticolinesterásicos con grupos amonio-cuaternario que causan bloqueo de canal abierto del nAChRm, como el BW284c51, también incrementan la desensibilización del receptor (Olivera-Bravo y cols., 2005), aunque otros, como el edrofonio, no la modifican, lo que indica que estas moléculas presentan lugares diferentes de unión al nAChRm, a pesar de su homología estructural (Olivera-Bravo y cols., 2007).

Los ALs que presentan aminas-terciarias en su estructura, como procaína, tetracaína y lidocaína son capaces, además, de inhibir nAChRs en estado cerrado (Adams, 1977; Papke y Oswald, 1989; Alberola-Die y cols., 2011 y 2013), a diferencia de los ALs con grupos amonio-cuaternario. Este efecto está mediado, probablemente, por la fracción de moléculas en forma no cargada (cuya proporción depende del pK de la molécula y del pH del medio), capaces de difundir a través de la membrana y actuar sobre puntos del nAChR no accesibles desde el lado extracelular.

Aparte de ALs y anticolinesterásicos, hay una gran diversidad de moléculas exógenas de interés clínico que actúan como MAN del nAChR, incluyendo: **a)** antibióticos, como la gentamicina, que incrementan marcadamente la desensibilización (Okamoto y Sumikawa, 1991); **b)** antipsicóticos, como la clorpromacina, que se une en el interior del canal y lo bloquea (Koblin y Lester, 1979; Arias, 1998); **c)** bloqueantes de canales de calcio, como el diltiazem, que inhiben nAChRns $\alpha_3\beta_4$ de forma voltaje-independiente, promoviendo su inactivación (Herrero y cols. 1999); **d)** riluzole, que a concentraciones utilizadas en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica bloquea nAChRms y aumenta su desensibilización (Deflorio y cols., 2012) y **e)** quinacrina, utilizada en el tratamiento de la malaria, que se une en la interfase lípido-proteína (Arias, 1998). Además, varias moléculas endógenas pueden modular de forma negativa la actividad de nAChRs, como sustancia P, serotonina, ácidos grasos o esteroides como

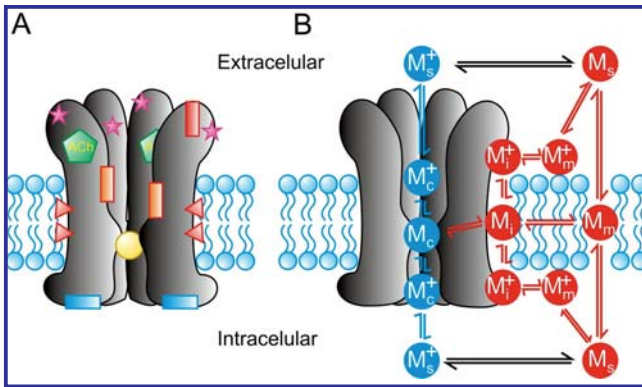


Figura 2. Lugares de unión y mecanismos de modulación en el nAChR. (A) Esquema del nAChR mostrando 4 de sus 5 subunidades para indicar los principales lugares de unión de sus moduladores (ver el texto para los detalles) (B) Esquema de las dos vías generales de actuación de los moduladores del nAChR. Mediante la vía hidrofílica (azul), los moduladores pueden interactuar con residuos extracelulares o de la luz del canal, accediendo desde el medio extracelular. Mediante la vía hidrofóbica (rojo), las moléculas interaccionan con aminoácidos de los segmentos transmembrana, penetrando desde la bicapa lipídica. M_s y M_s^+ representan, respectivamente, formas no cargadas y protonadas de moléculas en solución; M_m y M_m^+ simbolizan formas no cargadas y protonadas de moléculas en la membrana, respectivamente. La población de especies M_m^+ interactúa probablemente con lípidos cargados negativamente, mientras que las especies M_m pueden introducirse en el interior de la bicapa. M_i y M_i^+ indican moléculas neutras y cargadas en la interfase proteína-lípido; M_c y M_c^+ representan moléculas neutras y cargadas en el canal iónico. El equilibrio entre M_s^+ y M_s depende del estado del poro iónico. Cuando el canal se abre pueden penetrar rápidamente tanto M_s como M_s^+ por difusión simple, sin embargo, cuando permanece cerrado, sólo pueden alcanzar la luz del poro las especies neutras M_i , por medio de la vía hidrofóbica. Una vez que las especies no cargadas se encuentran en el interior del canal iónico pueden protonarse y adquirir carga.

progesterona, estradiol y corticosterona (Arias, 1998).

Modulación positiva del nAChR

Los MAPs son muy variados en cuanto a sus características moleculares, mecanismos de acción, potencia y especificidad. De acuerdo con los cambios funcionales que inducen sobre el nAChR, los MAPs se clasifican en 2 subtipos (Arias, 2010): i) tipo I, que incluye aquellos ligandos que favorecen la transición de cerrado a activo, lo que se refleja en una reducción de la EC_{50} para el agonista y un aumento del coeficiente de Hill y la amplitud de la corriente macroscópica evocada; y ii) tipo II, que incluye aquellos moduladores que fundamentalmente reducen la desensibilización o incluso favorecen el paso del receptor de estado desensibilizado a activo.

A pesar del interés que tienen estas moléculas, por su potencial terapéutico, poco se conoce aún de sus mecanismos de acción. Entre los MAPs de nAChRs heteroméricos se incluirían algunos iones divalentes (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}), antihelmínticos (ivermectina, levamisol, morantel), anticolinesterásicos (galantamina, flosotigmina) o antagonistas muscarínicos (atropina, escopolamina) (Arias, 2010). El estudio de los MAPs que actúan sobre los nAChRs heteroméricos ha avanzado lentamente, en parte por: **a)** ser selectivos, pero no siempre, en cuanto a la subunidad sobre la que actúan, pudiendo incluso presentar efectos contrarios en subunidades distintas. El Zn^{2+} (1-100 M) actúa como MAP de nAChRs con subunidades $\alpha 4\beta 2$, pero se comporta como MAN con receptores $\alpha 3\beta 2$ (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007); es más, el Zn^{2+} actúa como MAN en receptores $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, pero puede ser MAP en $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, al actuar potenciando en la interfase α - α , pero inhibiendo en la interfase α - β (Moroni y cols., 2008); **b)** depender marcadamente su efecto de una "ventana" de concentración, pudiendo pasar de MAP a MAN. Así, la galantamina a dosis bajas (0.1-1 μM) actúa como MAP y a dosis superiores a 10 μM como MAN (Samochocki y cols., 2003); algo similar ocurre con la atropina (Zwart y Vijverberg, 1997) y **c)** en algunos casos, ser específicos de

especie. El 17-estradiol, pero no otros esteroides, actúa de forma muy específica sobre un reducido número de aminoácidos en el C-terminal de la subunidad α del nAChR $\alpha 4\beta 2$ humano; sin embargo, no es MAP del nAChR equivalente de rata (Paradiso y cols., 2001).

Los MAPs de primera generación que actúan sobre nAChR $\alpha 7$, como el antihelmíntico ivermectina, la galantamina, el 5-hidroxiindol, SLURP-1 (proteína secretada por queratinocitos humanos) o algunos péptidos derivados de la albúmina sérica, han resultado tener poca potencia, eficacia o selectividad. Sin embargo, los MAPs de segunda generación, como los derivados de urea PNU-120596 y NS-1738, la acetamida denominada *compuesto 6*, o las amidas TQS y SB-206553, que son, en general, pequeñas moléculas apolares, han demostrado eficacia a nivel experimental reduciendo la desensibilización (MAPs de tipo II). Además, a nivel clínico se ha observado que mejoran el aprendizaje y revierten la pérdida de memoria, así como algunos déficits sensoriales propios de enfermedades psiquiátricas (Bertrand y Gopalakrishnan, 2007). El lugar de acción de los MAPs no está bien determinado. No obstante, se ha propuesto que el PNU-120596 se une en el dominio transmembrana implicando aminoácidos de los segmentos M1, M2 y M4, en una cavidad intrasubunidad, por lo que podría ser un lugar análogo al de unión de neuroesteroides y anestésicos volátiles en otros LGIC de la misma familia, como los receptores de GABA_A y glicina (Taly y cols., 2009). Sin embargo, otros MAPs de nAChR $\alpha 7$, como galantamina, podrían unirse en la región extracelular, en la interfase entre subunidades no- α , de forma similar a la unión de las benzodiazepinas al receptor de GABA_A.

Perspectivas futuras

El estudio de la modulación alostérica de nAChRs es de gran interés, dado que este tipo de modulación puede aportar ventajas terapéuticas sobre el empleo clásico de agonistas y antagonistas, al permitir aumentar o disminuir la respuesta a neurotransmisores endógenos sin producir una activación o inhibición permanente del nAChR. Además, los efectores alostéricos producen cambios más sutiles y diversos en la función de los receptores, actuando sobre distintos sitios en las diversas subunidades o en la interfase entre ellas. Previsiblemente, el avance en el conocimiento de la modulación alostérica de neuroreceptores permitirá desarrollar nuevas moléculas de interés clínico, que actúen selectivamente sobre subtipos específicos de receptores, con mayores márgenes terapéuticos de seguridad y menores efectos secundarios, lo que permitirá un mejor tratamiento de las patologías en las que la función de estos receptores esté afectada.

En la actualidad, se está trabajando intensamente en el desarrollo de nuevos MAPs y MANs de nAChRs orientados al tratamiento del tabaquismo, enfermedad de Alzheimer, dolor neuropático, esquizofrenia, desórdenes cognitivos y otros trastornos asociados a la disfunción de nAChRs.

Agradecimientos

Los autores están financiados por proyectos del MINECO CSD2008-00005 y BFU2012-31359.

Bibliografía

- Adams, P.R. (1977). Voltage-jump analysis of procaine action at frog end-plate. *J Physiol* **268**: 291-318.
- Alberola-Die, A., Martínez-Pinna, J., González-Ros, J.M., Ivorra, I., Morales, A. (2011) Multiple inhibitory actions of lidocaine on *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptors transplanted to *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* **117**(6): 1009-1019.
- Alberola-Die, A., Reboreda, A., Lamas, J.A., Morales, A. (2013) Lidocaine effects on acetylcholine-elicited currents from mouse superior cervical ganglion neurons. *Neurosci Res* **75**(3): 198-203.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Rogers, S.W. (2009) Mammalian acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **89**: 73-120.
- Anwyl, R., Narahashi, T. (1980). Comparison of desensitization and time-

- dependent block of the acetylcholine receptor responses by chlorpromazine, cytochalasin B, triton X-100 and other agents. *Br J Pharmacol* **69**: 99-106.
- Arias, H.R. (1998) Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* **1376**:173-220.
- Arias, H.R. (2010) Positive and negative modulation of nicotinic receptors. *Adv Protein Chem Struct Biol* **80**:153-203.
- Ashcroft, F.M. (2006) From molecule to malady. *Nature* **440**:440-447.
- Bertrand, D., Gopalakrishnan, M. (2007) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* **74**: 1155-1163.
- Deflorio, C., Palma, E., Conti, L., Roseti, C., Manteca, A., Giacomelli, E., Catalano, M., Limatola, C., Inghilleri, M., Grassi, F. (2012) Riluzole blocks human muscle acetylcholine receptors. *J Physiol* **590**: 2519-2528
- Giniatullin, R., Nistri, A., Yakel, J.L. (2005) Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci* **28(7)**: 371-378.
- Gotti, C., Clementi, F. (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* **74**: 363-396.
- Herrero, C.J., García-Palmero, E., Pintado, A.J., García, A.G., Montiel, C. (1999) Differential blockade of rat $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptors by omega-conotoxin MVIIC, omega-conotoxin GVIA and diltiazem. *Br J Pharmacol* **127(6)**:1375-87.
- Hogberg, C.J., Maliniak, A., Lyubartsev, A.P. (2007) Dynamical and structural properties of charged and uncharged lidocaine in a lipid bilayer. *Biophys Chem* **125**: 416-424.
- Hogg, R.C., Buisson, B., Bertrand, D. (2005) Allosteric modulation of ligand-gated ion channels. *Biochem Pharmacol* **70**:1267-1276.
- Horn, R., Brodwick, M.S., Dickey, W.D. (1980). Asymmetry of the acetylcholine channel revealed by quaternary anesthetics. *Science* **210**: 205-207.
- Hurst, R., Rollema, H., Bertrand, D. (2013) Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacol Ther* **137(1)**: 22-54.
- Koblin, D.D., Lester, H.A. (1979). Voltage-dependent and voltage-independent blockade of acetylcholine receptors by local anesthetics in *Electrophorus* electroplaques. *Mol Pharmacol* **15**:559-580.
- Moroni, M., Vijayan, R., Carbone, A., Zwart, R., Biggin, P.C., Bermudez, I. (2008) Non-Agonist-Binding Subunit Interfaces Confer Distinct Functional Signatures to the Alternate Stoichiometries of the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic Receptor: An $\alpha 4$ - $\alpha 4$ Interface Is Required for Zn^{2+} Potentiation. *J Neurosci* **28(27)**: 6884-6894
- Neher, E., Steinbach, J.H. (1978). Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol* **277**: 153-176.
- Neher, E. (1983). The charge carried by single-channel currents of rat cultured muscle cells in the presence of local anaesthetics. *J Physiol* **339**: 663-678.
- Ochoa, E.L., Chattopadhyay, A., McNamee, M.G. (1989) Desensitization of the Nicotinic Acetylcholine Receptor: Molecular Mechanisms and Effect of Modulators. *Cell Mol Neurobiol* **9(2)**: 141-178.
- Okamoto, T., Sumikawa, K. (1991) Antibiotics cause changes in the desensitization of ACh receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Brain Res* **9**:165-168.
- Olivera-Bravo, S., Ivorra, I., Morales, A. (2005). The acetylcholinesterase inhibitor BW284c51 is a potent blocker of *Torpedo* nicotinic AChRs incorporated into the *Xenopus* oocyte membrane. *Br J Pharmacol* **144**: 88-97.
- Olivera-Bravo, S., Ivorra, I., Morales, A. (2007). Diverse inhibitory actions of quaternary ammonium cholinesterase inhibitors on *Torpedo* nicotinic ACh receptors transplanted to *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* **151**: 1280-1292.
- Papke, R.L., Oswald, R.E. (1989). Mechanisms of noncompetitive inhibition of acetylcholine-induced single-channel currents. *J Gen Physiol* **93**: 785-811.
- Paradiso, K., Zhang, J., Steinbach, J.H. (2001) The C terminus of the human nicotinic $\alpha 4\beta 2$ receptor forms a binding site required for potentiation by an estrogenic steroid. *J Neurosci* **21**: 6561-68.
- Samochocki, M., Hoffle, A., Fehrenbacher, A., Jostock, R., Ludwig, J., Christner, C. y cols. (2003) Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholinereceptors. *J Pharmacol Exp Ther* **305**: 1024-36
- Sine, S.M., Taylor, P. (1982). Local anesthetics and histrionicotoxin are allosteric inhibitors of the acetylcholine receptor. Studies of clonal muscle cells. *J Biol Chem* **257**: 8106-8114.
- Steinbach, A.B. (1968). Alteration by xylocaine (lidocaine) and its derivatives of the time course of the end plate potential. *J Gen Physiol* **52**:144-61.
- Taly, A., Corringer, P.J., Guedin, D., Lestage, P., Changeux, J.P. (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Rev Drug Discover* **8**: 733-750.
- Unwin, N. (2000) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol* **346**: 967-989.
- Yakel, J.L. (2013) Cholinergic receptors: functional role of nicotinic acetylcholine receptors in brain circuits and disease. *Pflugers Arch* **465**:441-450.
- Zwart, R., Vijverberg, H.P.M. (1997) Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects. *Mol Pharmacol* **52**: 886-895.